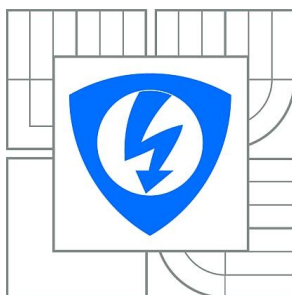


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNologiÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

SESTAVENÍ A HODNOCENÍ SETU IN VITRO JAMEK PRO CHONDROGENNÍ DIFERENCIACI MSC BUNĚK

CONSTRUCTION AND EVALUATION OF IN VITRO SET OF HOLES FOR CHONDROGENIC
DIFFERENTIATION OF MSC CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

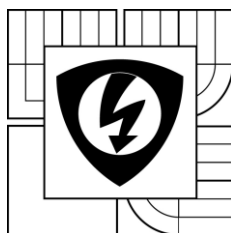
AUTHOR

MAREK KRÍŽ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Marek Kříž

Ročník: 3

ID: 147500

Akademický rok: 2013/14

NÁZEV TÉMATU:

Sestavení a hodnocení setu in vitro jamek pro chondrogenní diferenciaci MSC buněk

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s inkubačními in vitro jamkami pro inkubaci MSC buněk. Seznamte se s programováním řídicí jednotky pro stimulaci buněk a s čidly pro monitorování růstu buněk. 2) Vypracujte v této oblasti literární rešerši. 3) Prostudujte stávající inkubační in vitro jamky pro inkubaci MSC buněk a navrhnete vhodnou elektronickou část zajišťující generaci fyzikálních stimulů. 4) Navrhnete způsob řízení generace stimulů a řízení čidel monitorujících růst buněk. 5) Realizujte navržený způsob řízení stimulace a monitorování růstu. Otestujte systém na reálných vzorcích MSC buněk v in vitro jamkách. 6) Proveďte zhodnocení vytvořeného systému a diskusi nad testovanými vzorky.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] PANKAJ, G., CLIVE, D. M.: Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering (2008). J Chem Technol Biotechn 83:408–420.

[2] CHUN-WEI, H., GWO-BIN, L.: A microfluidic system for automatic cell culture (2007). J. Micromech. Microeng. 17 1266.

Termín zadání: 17.2.2014

Termín odevzdání: 31.7.2014

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá podmínkami kultivace mezenchymálních buněk in vitro, poškození kloubní chrupavky a její náhrady pomocí chondrogenních buněk. Další část se věnuje jednotlivým druhům regulace teploty pro vyhřívání a udržení teploty uvnitř uzavřeného systému, typům detektorů teploty a vyhřívání pomocí peltierova článku. Sestavení vyhřívacího boxu, měření teplotního profilu uvnitř boxu pomocí programu Labview, řízení pomocí platformy Arduino, přežíváním a diferenciací buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

In vitro, MSC, chondrocyty, regulace teploty, termistor, Arduino

ABSTRACT

Bachelor thesis concentrates on the cultivation of mesenchymal cells in vitro, damage to the articular cartilage and its replacement with the chondrogenic cells. The next section is devoted to each type of temperature control for heating and maintaining the temperature inside a closed system, the type of detector temperature and heating using the Peltier element. Assembly heater box, measuring the temperature profile inside the box with Labview program, control with Arduino platform, survival and differentiation of cells.

KEYWORDS

In vitro, MSC, chondrocytes, temperature control, thermistor, Arduino

KŘÍŽ, M. *Sestavení a hodnocení setu in vitro jamek pro chondrogenní diferenciaci MSC buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou semestrální práci na téma Sestavení a hodnocení setu in vitro jamek pro chondrogenní diferenciaci MSC buněk jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího semestrální práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené semestrální práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této semestrální práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu semestrální práce ing. Vratislavu Čmielovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Josefu Skopalíkovi za technickou pomoc a poskytnutí MSC buněk.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Kultivace buněk in vitro	2
2.1	Teplota, koncentrace a pH	2
2.2	Médium.....	2
2.3	Příprava buněk In-vitro.....	3
2.4	Návrty subchondrální kosti.....	3
2.5	Metody transplantace kloubní chrupavky.....	4
2.6	Přenos osteoartikulárních štěpů	4
3	Řízení teploty pro kultivaci in-vitro	5
3.1	Regulace teploty	5
3.2	Teplotní senzory a vyhřívací elektronické prvky	8
3.3	Snímání teploty pomocí programu LabView	9
3.4	Test jednoduchého vyhřívaného boxu a snímání teplotního profilu pomocí Labview	9
3.5	Test profilu	12
4	Sestavení boxu	14
5	Komplexní vyhřívání BOX.....	15
5.1	Realizace pomocí platformy Arduino.....	16
5.2	Schéma zapojení tranzistorů	18
5.3	Měření teploty.....	18
5.4	Regulace koncentrace kyslíku	19
5.5	Zapojení	21
5.6	Tepelné ztráty	22
5.7	Teplotní stabilita systému.....	27
5.8	Výstup systému.....	27
6	Test přežívání a diferenciaci buněk v základní verzi boxu a v komplexní verzi boxu.....	28
6.1	Test základní verze vyhřívaného boxu	28
6.2	Test komplexní verze vyhřívaného boxu.....	30
7	Diskuze	33
8	Závěr.....	34

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Blokové schéma regulované soustavy [5].....	5
Obr. 2: Zapojení zesilovače pro P regulaci [5].....	6
Obr. 3: Schéma zapojení I regulace [5].....	7
Obr. 4: Schéma zapojení D-regulace [5]	7
Obr. 5: Blokové schéma PID regulátoru [5]	8
Obr. 6: Blokové schéma zapojení měření teploty pomocí NTC a programu Labview	9
Obr. 7: Vyhříváný box s připojenými Peltierovými články	10
Obr. 8: Vyhříváný box s Petriho miskou.....	11
Obr. 9: Měření teploty pomocí programu Labview	12
Obr. 10: Blokové schéma systému vyhříváného boxu	14
Obr. 12: Sestavený komplexní box	15
Obr. 11: Zobrazení jednotlivých částí systému	15
Obr. 13: vývojová deska ARDUINO UNO R3 [7]	16
Obr. 14: Ukázka programovacího prostředí Arduina.....	17
Obr. 15: Schéma zapojení pro spínání peltierových článků.....	18
Obr. 16: Schéma odporového děliče pro měření teploty.....	19
Obr. 17: Kyslíkový senzor (převzato z [11]).....	20
Obr. 18: Schéma zapojení pro spínání ventilu	20
Obr. 19: Ventil pro regulaci kyslíku.....	20
Obr. 20: Zapojení zesilovače.....	21
Obr. 21: Zapojení stabilizátoru napětí.....	22
Obr. 22: Výstup systému po připojení k počítači přes USB	27
Obr. 23: typická morfologie MSC buněk po 24 hodinách	28
Obr. 24: Buňky obarvené barvivem Alcain blue.....	29
Obr. 25: MSC buňky po 24 hodinách - 1.vzorek	30
Obr. 26: Buňky obarvené Calceinovou metodou - 1.vzorek.....	31
Obr. 27: MSC buňky po 24 hodinách - 2.vzorek	31
Obr. 28: Buňky obarvené Calceinovou metodou - 2.vzorek.....	32

Seznam tabulek

Tabulka 1: Naměřené hodnoty teploty pro vyhřívání boxu	13
Tabulka 2: Vypočítaný výkon a změřená teplota	23

1 Úvod

Pro výzkum a léčbu nemocí jsou v dnešní době nepostradatelnou součástí buněčné kultury kultivované in vitro (mimo organismus, ve skleněných nebo plastických nádobkách). Tato metoda přináší výhody jako např. homogenitu prostředí a následně homogenitu velikosti a parametrů výsledných buněk, možnost jednoduše měnit podmínky kultivace. Při tomto procesu kultivace je také respektován etický kodex.

Základní podmínkou kultivace buněk je stabilní prostředí. Pokud je zkoumána diferenciací buněk, je nutné udržovat prostředí podobné lidskému organismu. Pokud nejsou dodrženy podmínky kultivace, může dojít k nepřirozenému vývoji buněk nebo změně jejich struktury. Důležitým parametrem při kultivaci je teplota a při růstu buněk má nezastupitelnou úlohu výběr vhodného kultivačního média.

Plastikové nebo skleněné nádoby nebo sestavy jamek s buňkami se udržují při vhodné teplotě v tzv. inkubátorech. Tyto inkubátory také zajišťují obvykle ochranu před nečistotami a mikroby v ovzduší, celkový definovaný atmosférický tlak, případně parciální tlak určitého atmosférického plynu.

V této práci se zabývám regulací a udržováním teploty uvnitř experimentálního vyhřívaného boxu, který byl ve spolupráci s pracovníky Lékařské fakulty MU speciálně navržen pro inkubaci malých in vitro kultivačních jamek s buňkami. Jsou zde popsány základní druhy regulovaných soustav a jednotlivé typy regulátorů, měření teplotního profilu vyhřívaného boxu i zhodnocení přežívání buněk v této sestavě.

Pro první zkoušky byl použit program Labview, pomocí kterého byla měřena homogenita boxu. Dále byla použita platforma Arduino, která slouží k ovládání výsledného systému, měření teploty, její regulaci a regulaci kyslíku uvnitř boxu.

2 Kultivace buněk in vitro

Buňky mnohobuněčných organismů jsou uzpůsobeny přežít začleněny do mnohobuněčné struktury, kde většinou každá buňka má specifický úkol. Souhru fungování buněk a jejich přežití pak řídí například nervová soustava nebo jiný mechanismus (např. parakrynní komunikace). Jen část buněk mnohobuněčného organismu je možno bez ztráty životaschopnosti vyjmout z mnohobuněčného organismu a kultivovat samostatně. U buněk savců lze kultivovat například krevní buňky, buňky kostní dřeně a po omezenou dobu i svalové nebo kostní buňky. Poměrně ochotně lze in vitro držet i kmenové buňky. Pro tuto kultivaci buněk savců *in-vitro* je nutné zajistit určité podmínky, při kterých daný typ buněk bude schopen přežít. Těmito podmínkami jsou:

- teplota,
- koncentrace O_2 a CO_2 ,
- médium - vlastní složení,
- adheze,
- fetální bovinní sérum.

2.1 Teplota, koncentrace a pH

Pro správný růst buněk in-vitro je potřeba stabilní prostředí. Kultivace probíhá v uzavřeném systému. Základní podmínkou pro kultivaci lidských buněk je stálá teplota blízká tělesné teplotě. Tato teplota by měla být v rozmezí 36 - 37 °C. Snížená teplota může zpomalovat, příp. zastavit růst buněk, zatímco zvýšená teplota může mít za následek odumírání buněk. To je způsobeno denaturací enzymů a proteinů. Buňky jsou schopny přežít při teplotě 42 °C asi 24 hodin a při teplotě 45 °C je to pouze 30 minut. Snížená teplota se dá také využít ke krátkodobému nebo dlouhodobému uchování buněk. Dále je nutná stabilní atmosféra s koncentrací CO_2 5% a dostatečné koncentraci O_2 (optimální koncentrace O_2 není stále jasně definována, protože uvnitř tkání není klasická koncentrace 20% jako v atmosférickém prostředí). Zvýšená koncentrace CO_2 se podílí na udržování stálého pH. Většinou je pH udáváno kolem 7,2 - 7,4, to ovšem nemusí platit pro všechny druhy buněk. Některé buňky vyžadují buď zvýšené nebo snížené pH, [2].

2.2 Médium

Každé médium pro kultivaci buněk musí obsahovat osm esenciálních aminokyselin (tryptofan, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, valin, leucin a isoleucin). Dále vitamíny (přítomnost a koncentrace je závislá na druhu buněk), ionty (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} a HCO_3^-), sacharidy - hlavní zdroj energie, antibiotika (streptomycin a penicilin) a sérum (telecí a bovinní sérum).

Mezenchymální stromální buňky (MSC - Mesenchymal stem cells), které jsou použity pro diferenciaci in-vitro se mohou izolovat z několika typů lidské tkáně. Hlavním zdrojem je kostní dřeň, tuková tkáň, pupečnicková krev a různé zárodečné tkáně. Tyto buňky se mohou diferencovat do různých druhů tkání - kostí, šlach, chrupavek, tukové tkáně, svalů, [2][1].

2.3 Příprava buněk In-vitro

MSC buňky se nejčastěji kultivují v DMEM nebo RPMI mediu s přidavkem fetálního nebo jiného séra (obvykle 2 - 20%). Nasazují se obvykle v hustotě 1 - 10 tis/cm² na plastické nebo skleněné Petriho misky nebo kultivační lahve. Dělení probíhá poměrně rychle, po jednom až dvou týdnech je kultivační povrch zcela zaplněn a je potřeba je pasážovat (tzv. ztrypsinizovat a rozsadit)

In vitro MSC buňky se při kultivaci pevně adherují na dně plastové misky. Pro jejich oddělení je potřeba nanést na buňky roztok trypsinu. Ten způsobí, že se MSC buňky oddělí ode dna misky. Tento proces trvá asi 10 minut, kdy je miska v inkubátoru o teplotě 37°C a koncentraci CO₂ 5%. Dále se buňky zalijí roztokem obsahující DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) + FBS (Fetální bovinní sérum) + 2% roztok penicilinu a streptomycinu. Poté je miska znovu vložena do inkubátoru. Po uplynutí 7 - 10 minut slitý roztok s buňkami ve zkumavce vložíme do centrifugy. Centrifuga se obvykle nastavuje na 1200 otáček/min po dobu 5-10minut podle velikosti stáčeného objemu zkumavky, dokud se na dně zkumavky neusadí buňky. Poté se pomocí pipety odsaje roztok nad peletou buněk. Pro další kultivaci je potřeba znát koncentraci buněk v 1ml. Množství je zjišťováno pomocí Bürkerovy komůrky.

MSC buňky jsou jedním typem kmenových buněk, které jsou schopny se přeměnit na chondrocyty (chrupavčité buňky). Chceme-li nastartovat chondrocytární diferenciaci MSC buněk, musíme buňky nasadit ve vyšší hustotě a do media přidat některé chondrocytární růstové faktory. Dobře odzkoušenou metodou v praxi je například komerční kit STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit (výrobce Gibco): 80 tisíc buněk přeneseme pomocí pipety na Petriho misku. Buňky musí být na misce koncentrovány do jednoho místa, aby byl zachován kontakt mezi jednotlivými buňkami. Poté se Petriho misky vloží do inkubátoru na 2 hodiny, aby se buňky dobře adherovali ke dnu a vytvořili kompaktní shluk. Poté přidáme diferenciací médium (STEMPRO Chondrogenesis Supplement) a vrátíme do inkubátoru. Diferenciační médium vyměňujeme za čerstvé každé 2-3 dny. [2] Po cca 14 dnech jsou z velkého procenta MSC buněk chondrocyty protáhlého tvaru, o kterých lékaři uvažují jako léčebném agens, které je možno transplantovat do místa defektu chrupavky kolenního nebo jiného kloubu. Tato metoda je teprve ve stádiu testování - v současnosti existuje několik dalších alternativ opravy defektu nebo náhrady celého tělesa kloubu, pro ilustraci uvedme stručný přehled: návrtý subchondrální kosti, metody transplantace kloubní chrupavky, přenos osteoartikulárních štěpů.[2]

2.4 Návrtý subchondrální kosti

Je nejstarší a nejjednodušší metodou pro opravu kloubního povrchu chrupavčitou tkání. V místě bez chrupavky či s její pokročilou degenerací se po vyčištění provedou návrtý nebo záseky do subchondrální kosti. To vede ke snížení nitrokostního tlaku. Tím dojde k vycestování nediferenciovaných buněk z kostní dřene a současně dojde ke krvácení, z něhož

vzniká fibrinová síť pro případnou diferenciaci kmenových buněk. Ty se podílí na tvorbě nového kloubního povrchu.

2.5 Metody transplantace kloubní chrupavky

Přenos štěpů z měkkých tkání

Tato metoda používá úplně nový přístup. Je založena na principu vysazení chondrocytů do dříve připraveného kostního lůžka. Tyto chondrocyty jsou předem odebrány pacientovi z nepoškozené a nezatěžované tenké kloubní lamely vitální chrupavky (1.fáze) a namnoženy in vitro kultivací (mimo organismus pacienta). Po dosažení potřebné koncentrace chondrocytů in vitro, je proveden zákrok na opravení poškozené chrupavky pomocí kultivovaných buněk (2.fáze). Tato metoda je indikována pro symptomatické lokální defekty kloubní chrupavky. Většinou se jedná o mladší pacienty, kteří jsou schopni akceptovat pooperační režim. Úspěch léčby je závislý na těchto faktorech: typu poškození kloubní chrupavky, kvalitě vlastního štěpu a také na kvalitě kostního lůžka. Má-li pacient hluboký kostní defekt, je potřeba provést plastiku kosti, která se provádí v první fázi. Poté je možnost standardně uložit kostní materiál. Metoda přenosu autologních chondrocytů (buněk pocházející od samotného pacienta) funguje jako regenerace kloubního povrchu i s některými pooperačními komplikacemi. Ovšem její výsledky nejsou tak odlišné od ostatních léčebných metod. Její velkou nevýhodou je vysoká cena a také nedostatečné dlouhodobé zkušenosti.

2.6 Přenos osteoartikulárních štěpů

Tato metoda se používá k lokalizovanému ošetření poškozeného kloubního povrchu (nejčastěji na rozšířených kloubních koncích kosti stehenní). Metoda se provádí odebráním osteochondrální "sazenice" z nezatěžové oblasti kloubu. Tyto "sazenice" se následně uloží do předem připraveného kostního lůžka v místě defektu chrupavky. To znamená, že se poškozená chrupavka nahrazuje již plně zralou chrupavkou a není nutné čekat na pomalou regeneraci. Tato metoda se považuje za miniinvazivní, protože se provádí za artroskopické asistence a tedy málo zatěžuje pacienta. Problémem může být místo odběru "sazenice". Výsledky této metody jsou podobné jako ošetření za pomoci autologních chondrocytů, [2], [8].

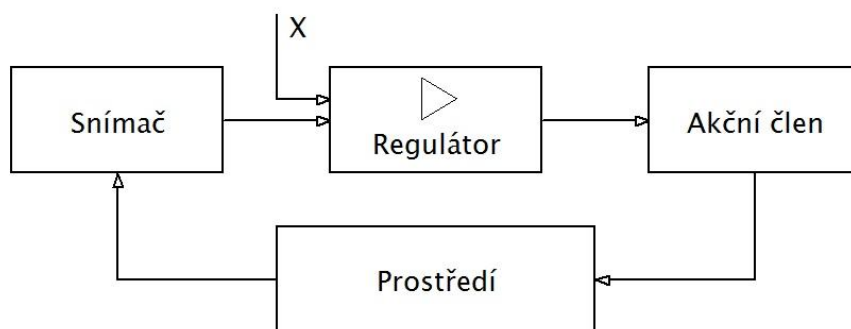
3 Řízení teploty pro kultivaci in-vitro

3.1 Regulace teploty

Pro pochopení problematiky si definujeme regulovanou soustavu (viz Obr. 1). Tato soustava se skládá ze snímače měřené veličiny, v našem případě termistorů NTC 640 3K3, nebo snímače jiné veličiny (tlaku, vlhkosti). Dále soustava obsahuje akční člen, který upravuje velikost měřené veličiny. V našem případě se jedná o Peltierův článek, který slouží jako vyhřívání. Článek je řízen regulátorem, pro náš účel slouží ATmega8-16PU zapojený do regulačního obvodu. Vstupem regulované soustavy je snímaná veličina (teplota), ta je v regulátoru odečtena od požadované teploty. Dostaneme rozdíl teplot a podle velikosti regulační odchylky se reguluje výkon Peltierova článku. Regulační odchylka e se vypočítá podle vzorce (1.), [12], [5].

$$e = x - y \quad (1.)$$

kde x představuje řídicí veličinu, která slouží jako srovnávací hodnota k regulované veličině y



Obr. 1: Blokové schéma regulované soustavy [5]

3.1.1 Spojitá regulace

Při spojité regulaci je akční člen řízen plynule se měnícím napětím. Při velkém rozdílu skutečné a požadované teploty akční člen pracuje na plný výkon. Jak se teplota blíží požadované teplotě, snižuje se výkon akčního členu a při dosažení požadované teploty se udržuje výkon, který se rovná úniku tepla do okolí. Nevýhodou spojité regulace jsou velké výkonové ztráty.

3.1.2 Nespojité regulace

Při nespojité regulaci se nepracuje s konstantním napětím, ale se skokovým. Napětí na akčním členu se mění skokově, řídicí člen se chová jako spínač. Nespojitá regulace se používá tam, kde není potřeba stálé působení akčního členu. Výhodou této regulace jsou minimální ztráty řídicího členu (jednotky %).

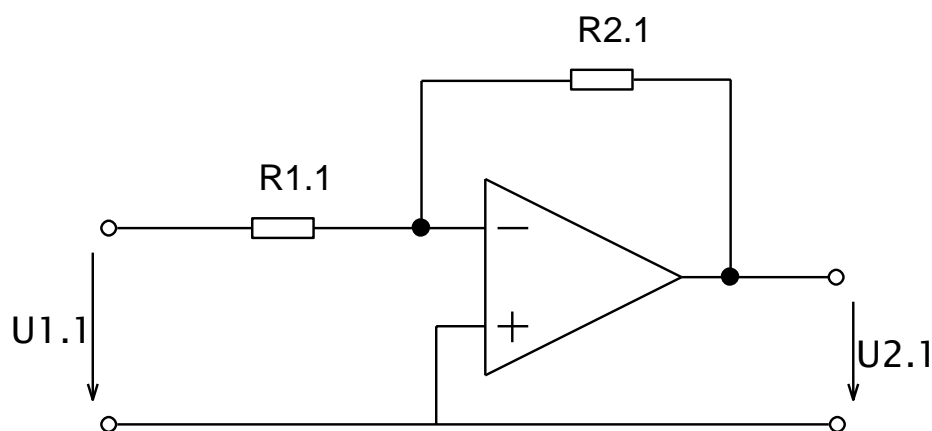
3.1.3 P regulace

Proporcionální "P" regulátor je nejjednodušším spojitým regulátorem. Ten využívá principu přímé úměrnosti. To znamená že čím je větší regulační odchylka, tím větší je akční zásah. P regulátor se dá popsat jako obyčejný zesilovač, se zesílením K , který je dán vztahem (2)

$$K = \frac{U_2}{U_1} = \frac{R_2}{R_1} \quad (2.)$$

kde poměr $R_{2.1}$ ku $R_{1.1}$ je poměr velikostí odporů v základním zapojení zesilovače (viz Obr. 2). Výstup u je tedy dán vztahem (3.), kde K je zesílení a e regulační odchylka (3.).

$$u = K \times e \quad (3.)$$



Obr. 2: Zapojení zesilovače pro P regulaci [5]

Výhodou P regulátoru je především jeho jednoduchost, rychlý průběh regulace a stabilita. Nevýhodou je trvalá regulační odchylka. To znamená, že nejsou schopny zcela odstranit rozdíl mezi skutečnou a žádanou hodnotou regulované veličiny. Tento druh regulátoru není vhodný pro regulované soustavy vyššího řádu.

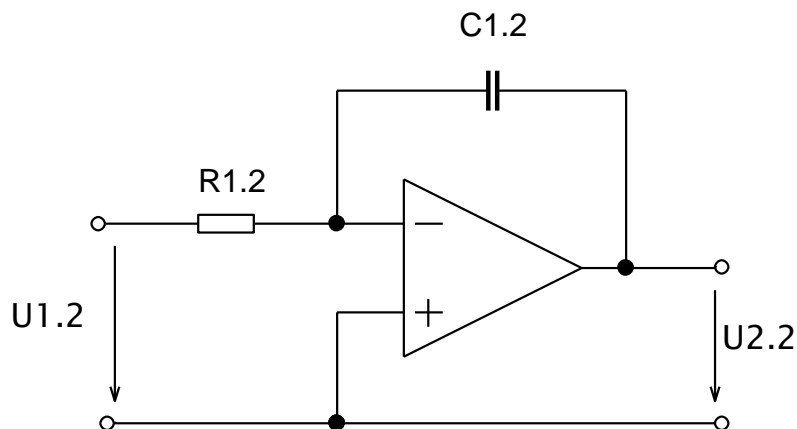
3.1.4 I regulace

Při použití integrálního I regulátoru je změna akční veličiny úměrná časové hodnotě integrálu z regulační odchylky. To znamená, že aktuální rychlost změny akční veličiny přímo závisí na velikosti regulační odchylky (4.)

$$u \sim \int e dt \rightarrow u' \sim e \quad (4.)$$

I regulátor je schopen zcela odstranit regulační odchylku. Existuje-li regulační odchylka, hodnota integrálu není nulová a regulátor je aktivní. Tuto vlastnost nemá P regulátor ani D regulátor (viz 3.1.5). Avšak tato výhoda je vykoupena zhoršením stability regulačního obvodu. To znamená, že obvod řízený I regulátorem bývá zpravidla kmitavý. To má za následek prodloužení přechodového děje - dobu ustálení soustavy. Proto se I regulátor samostatně téměř nepoužívá. Využívá se ve spojení s P regulací. PI regulace

spojuje výhody obou regulačních systémů. I regulátor tedy odstraňuje regulační odchylku a P regulátor zkracuje dobu regulačního pochodu.



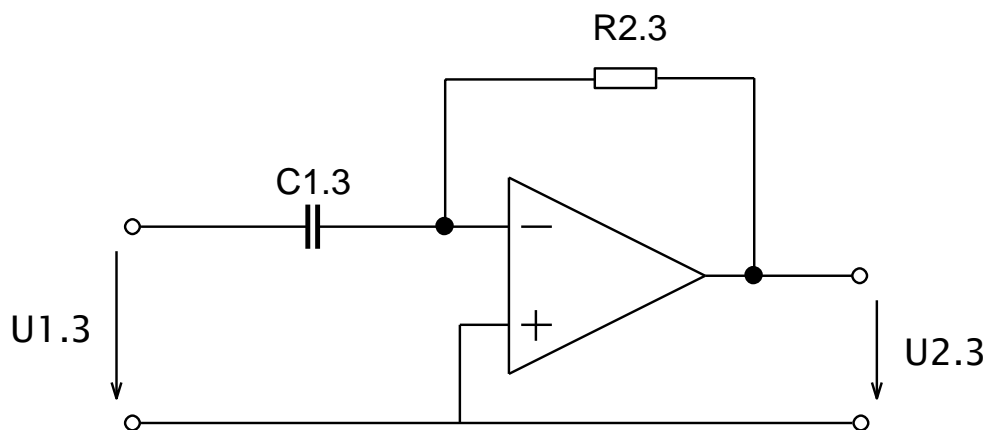
Obr. 3: Schéma zapojení I regulace [5]

3.1.5 D regulace

Derivační *D* regulátor je velmi podobný I regulátoru. Změna akční veličiny je úměrná hodnotě derivace regulační odchylky. To znamená, že hodnota akční veličiny odpovídá okamžité hodnotě rychlosti změny rozdílu mezi žádanou a skutečnou hodnotou regulované veličiny (5.).

$$u \sim e' \rightarrow (w - y)' \quad (5.)$$

V praxi není možné použít *D* regulátor samostatně. To je dáno jeho vlastností zesilovat derivaci šumové napětí, neschopností reagovat na ustálenou hodnotu regulační odchylky a nestabilitu regulačního obvodu. Nestabilita je způsobena velkými odezvami *D* regulátoru na prudké změny regulační odchylky. To může vést k nekontrolovatelnému rozkmitání regulačních orgánů. Proto se používá v kombinaci s předešlými regulátory. Kombinací PID regulátoru zlepšuje stabilitu regulace, zkracuje dobu kmitů akční veličiny a snižuje rychlost reakce regulačního obvodu na poruchu. Ovšem jen do určité míry. V případě velké derivační konstanty může vlastnosti regulačního obvodu zhoršit. To je patrné u systémů s vysokou hladinou šumu, na který regulátor reaguje rozkmitáním akčního členu.



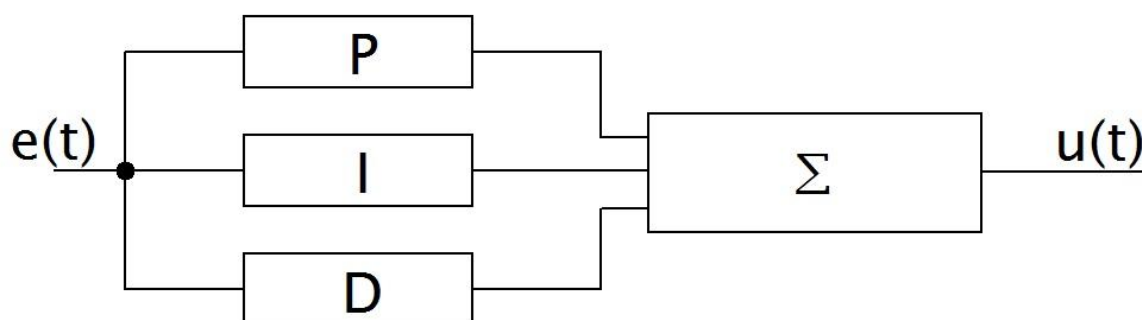
Obr. 4: Schéma zapojení D-regulace [5]

3.1.6 PID regulace

Kombinováním základních typů regulátorů můžeme dosáhnout vyšší kvality regulace. Kombinace se realizují třemi způsoby.

- Paralelní řazení regulátorů - dosahuje se nejkvalitnějšího výsledku za cenu vyššího počtu zesilovačů.
- Sériovým řazením regulátorů - nežádoucím jevem je vzájemné ovlivňování parametrů při jejich nastavování.
- Složenými impedancemi - kapacita a ohmický odpor je zařazena složená impedance těchto dvou prvků, stačí pouze jeden zesilovač, ale kvalita regulátoru je nižší.

Nejčastějším použitím je realizace paralelním řazením jednotlivých bloků. Toto řazení je zobrazeno na Obr. 5. Zpracování regulační odchylky viz rovnice (1.) je rozloženo u PID regulátoru do tří paralelně pracujících složek, která každá svým způsobem ovlivňuje velikost tzv. akčního zásahu, tj. změnu akční veličiny u tak, jak je to podle jejich názoru pro odstranění existující regulační odchylky nezbytné, [5].



Obr. 5: Blokové schéma PID regulátoru [5]

3.2 Teplotní senzory a vyhřívací elektronické prvky

Termistor

Termistor (NTC) je polovodičová součástka bez NP přechodu. Její hlavní vlastností je velký záporný teplotní součinitel α . To znamená, že odpor termistoru klesá se zvyšující teplotou. Protože teplotní součinitel nemá při všech teplotách stejnou hodnotu, zmenšuje se odpor termistoru nelineárně při zvyšování teploty,[1].

Peltierův článek

Peltierovy články využívají Peltierova jevu, který spočívá v tom, že pokud jsou k sobě spojeny dva vodiče z rozdílného materiálu, z nichž každý má jinou výstupní práci a prochází jimi stejnosměrný proud, tak se spoj buďto zahřívá nebo ochlazuje. Záleží na směru průchodu proudu. Existují různé druhy peltierových článků (Single - stage peltier Cooler, Two - Stage Peltier Coolers) a jejich výběr závisí na příslušném použití. Výrobci udávají tyto parametry

$I_{MAX} = 3$ až 40 A, $U_{MAX} = 2,30$ až $17,60$ V, $\Delta T_{MAX} = 72$ až 72 °C, $P_{CMAX} = 3,80$ až 95 W. Tyto hodnoty jsou pro Single-Stage Peltier Cooler,[3].

Zapojení termistoru

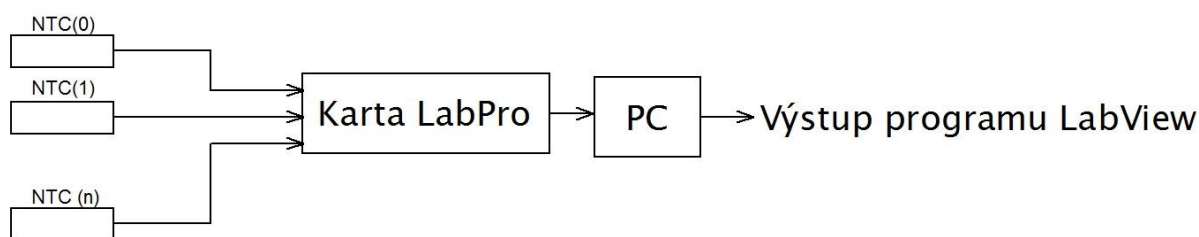
Pro měření teploty byl použit NTC termistor. Jeho parametry jsou dány výrobcem. Odpor udávaný výrobcem při $T = 25$ °C je $R = 3300$ Ω, rozsah teplot $T_{min} = -40$ °C, $T_{max} = 150$ °C. Jednotlivé termistory se zapojí paralelně a připojí se k nim stabilní zdroj proudu. Zdroj proudu se použije proto, aby mohlo dojít k přeměně fyzikální veličiny (odporu) na elektrický signál (napětí).

3.3 Snímání teploty pomocí programu LabView

Jednotlivé termistory jsou připojeny ke kartě LabPro, která je připojena k PC. Výstupy z karty jsou zpracovány pomocí programu Labview, kde se provede převod naměřených odporů jednotlivých termistorů na napětí. Pro převod je použit vzorec daný výrobcem (6).

$$T = (A_1 + B_1 \times \ln \frac{R}{R_{ref}} + C_1 \times \ln^2 \frac{R}{R_{ref}} + D_1 \times \ln^3 \frac{R}{R_{ref}})^{-1} \quad (6.)$$

Konstanty A_1 , B_1 , C_1 a D_1 udává výrobce ve výrobním listu. Hodnota R je naměřená hodnota odporu na termistoru a hodnota R_{ref} je hodnota odporu termistoru při $T = 25$ °C. Tuto hodnotu také udává výrobce. Výsledná vypočítaná teplota je v Kelvinech. Proto je v programu převedena na °C. Výstupem programu je aktuální hodnota teploty v K, °C a grafický záznam teploty v °C. Jednotlivé kroky jsou zobrazeny na Obr. 6.



Obr. 6: Blokové schéma zapojení měření teploty pomocí NTC a programu Labview

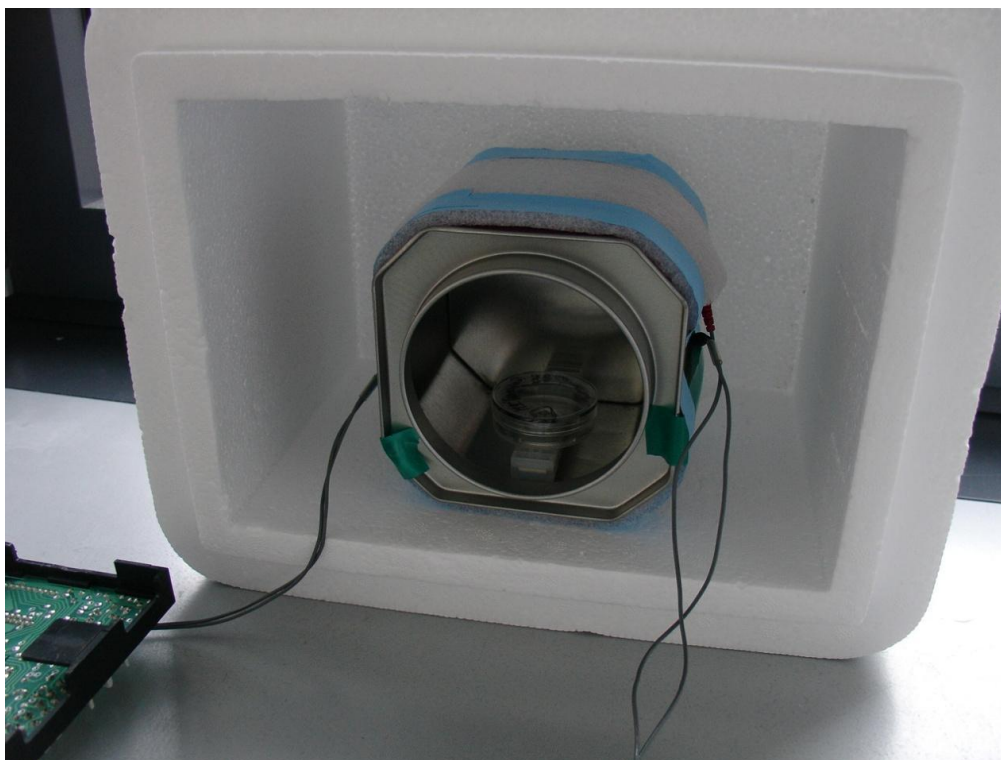
3.4 Test jednoduchého vyhřívaného boxu a snímání teplotního profilu pomocí Labview

Jako vyhřívaný box použijeme hliníkový box (velikost $10 \times 10 \times 9$ cm) s otvíratelnou přední stěnou, kterou se vkládá Petriho miska s buňkami (Obr. 7). Petriho miska (použité misky P35G-1.5-10-C, výrobce MaTTEK, průměr 35 mm, výška 12 mm, materiál PE se skleněným dnem) je v boxu položena na vyvýšeném plastovém držáku, nikoli přímo na plechovém dně boxu (hrozí nebezpečí velmi rychlého ohřevu od přenosu tepla ze stěny boxu) (Obr. 8). Miska

s buňkami je tedy ohřívána vzduchem, nikoli přímým kontaktem s vyhřívanými stěnami. Pro vytápění boxu jsou použity dva peltierovi články M-TEC-12705 (15 V, 68 W) a pro detekci vnitřní teploty je použit jeden teploměr termistor NTC 640 3K3 umístěný nad miskou. Ty jsou napájeny stejnosměrným napětím. Články jsou připevněny k bočním stěnám vyhřívaného boxu. Mezi článkem a stěnou je nanесena teplovodivá pasta Amasan T12 (Jurgen Armack GmbH, Německo), která slouží k lepšímu přenosu tepla. Na vnější straně peltierova článku bude pasivní chlazení. Box bude obalen izolací, aby nedocházelo k úniku tepla (polystyren). Spínání článků je řízeno pomocí procesoru ATmega a je spínáno tranzistorem, celý systém je napájen trafem 12 V, návrh byl realizován jako modifikace odzkoušeného experimentálního topného tělesa sestaveného na Lékařské fakultě MU. Výhodou tohoto zapojení je, že centrální regulační prvek, procesor ATmega, je zde možno variabilně a poměrně jednoduše naprogramovat, dle požadované přesnosti nebo teplotních intervalů podle biologického vzorku. Pro naši konkrétní regulaci vytápění malého plechového boxu na 37 °C jsme zvolili již zmíněnou P-regulaci, kvůli její jednoduchosti. Pro regulaci použijeme modifikaci již dříve vyzkoušeného program pro ATmega 16, který pracuje na principu P regulace.



Obr. 7: Vyhřívavý box s připojenými Peltierovými články

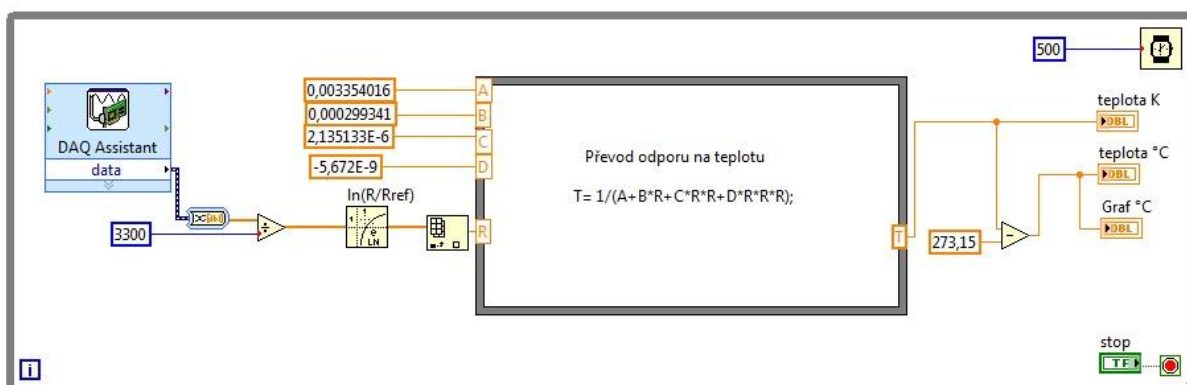


Obr. 8: Vyhříváný box s Petriho miskou

Základním testem bylo ověřeno, že při teplotě nižší než 37 °C jsou topné články zapnuty a při přibližování k teplotě 37 °C články postupně snižují topný výkon. Nepozoroval jsem v žádném vnějším ani vnitřním místě boxu nebezpečné žhnutí nebo teplem vyvolanou deformaci boxu nebo obalových materiálů.

3.5 Test profilu

Důvodem testu teplotního profilu vyhřívaného boxu je zjištění, zda nedochází k lokálnímu zvýšení teploty nad určitou nebezpečnou hranici. Tato hranice je stanovena teplotou, kterou jsou MSC buňky schopné přežít. Pro měření bylo použito 5 teplotních čidel (termistorů NTC 640 3K3) které byly umístěny do boxu. Celkem 4 čidla po stranách Petriho misky (levý dolní roh - 1 cm od stěn, analogicky levý horní roh, pravý horní a dolní roh) a jedno čidlo uprostřed boxu u Petriho misky, které velmi dobře mapují rozložení aktuální teploty a možné přehřátí části boxu. Jednotlivé termistory byly připojeny na kartu Labview, která je připojena k PC. Měření teploty bylo prováděno pomocí programu Labview (Obr. 9).



Obr. 9: Měření teploty pomocí programu Labview

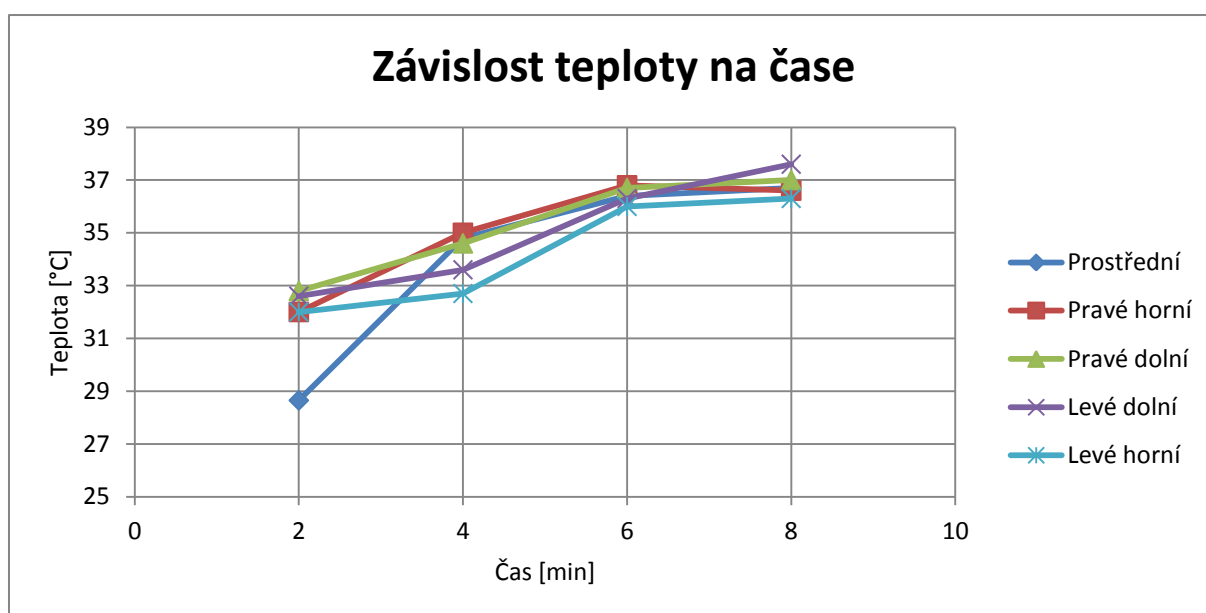
Vstupem programu jsou hodnoty odporu naměřené pomocí termistorů NTC 640 3K3, ty jsou načítány blokem DAQ Assistant. Hodnoty odporu jsou děleny hodnotou odporu udávanou výrobcem při $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, tedy $R=3300\text{ }\Omega$. Poté hodnoty vstupují do bloku přirozeného logaritmu a následně jsou přepočítány pomocí převodního vzorce. Výstupem je tedy teplota, nikoliv odpor. Teplota je zobrazena v kelvinech a také přepočítána na $^{\circ}\text{C}$ a vykreslena do grafu,[10].

//Pozn: Naměřené hodnoty jednotlivými čidly při prvotním nastavení převodních konstant A, B, C, D (viz Obr. 9 – centrální převodní blok) a spuštění programu v Labview neodpovídaly skutečnosti. Proto bylo nutné provést kalibrační měření za pomoci přesného teploměru při teplotách 20 a 37 $^{\circ}\text{C}$. Zjistili jsme, že rozdíl mezi naměřenou a skutečnou teplotou je 6,5 $^{\circ}\text{C}$. O tuto hodnotu byl tedy upraven vzorec (odečetl od všech naměřených hodnot).//

Výsledky měření těmito pěti čidly při vyhřívání inkubátoru z pokojové teploty jsou uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty teploty pro vyhřívání boxu

čas - t [min]	Teplotní čidla - teplota [°C]				
	Prostřední	Pravé horní	Pravé dolní	Levé dolní	Levé horní
2	28,65	32	32,8	32,6	32
4	34,8	35	34,6	33,6	32,7
6	36,4	36,8	36,7	36,3	36
8	36,7	36,6	37	37,6	36,3



Graf 1: Závislost teploty na čase pro jednotlivá teplotní čidla

Tento graf znázorňuje teplotu měřenou v čase na jednotlivých čidlech a ukazuje tak, zda je teplota při vytápění boxu prostorově homogenní. Tedy jestli se některá část boxu nezahřívá rychleji. Tento nesoulad by mohl mít za následek odumírání buněk. Z naměřených hodnot (Tabulka 1) vyplývá, že teplota se v celém boxu mění rovnoměrně a nedochází k výkyvům teplot (Graf 1).

4 Sestavení boxu

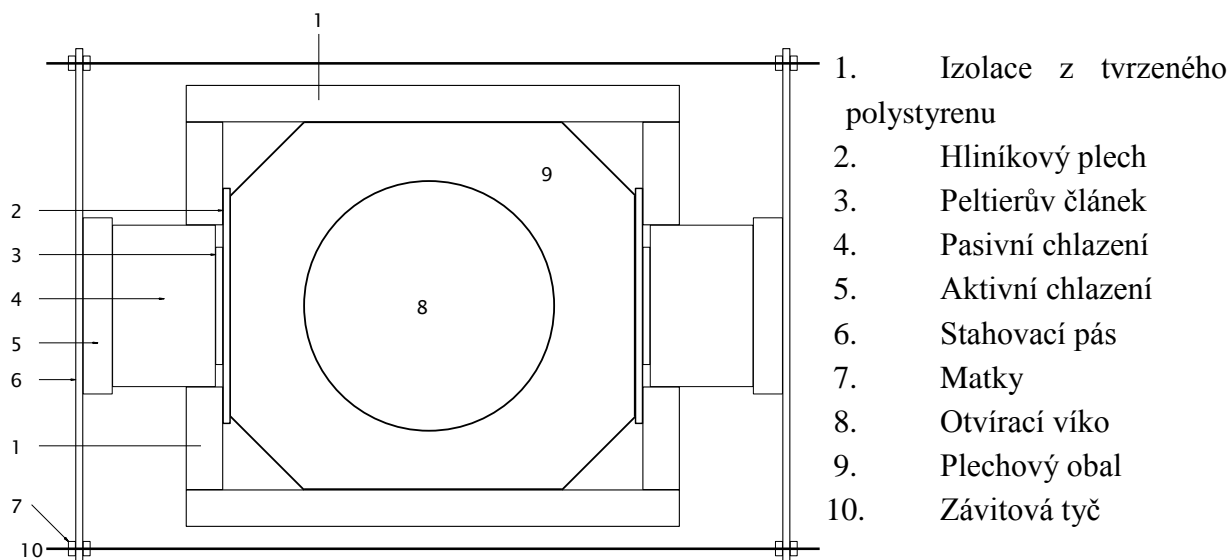
Sestavený box se skládá z těchto částí: Arduino, peltierovi články, ventil, čidlo pro kyslík a teplotu. Celé schéma je zobrazeno na Obr. 10, kde je zobrazováno ovlivňování jednotlivých bloků. Vše je řízeno deskou Arduino. Ta spouští peltierovi články a ventil pomocí tranzistorů BUZ11. Při spuštění článků se zvýší teplota uvnitř boxu a tuto změnu zaznamená teplotní čidlo, které odesílá informace o teplotě do Arduino. Arduino dále podle nastaveného programu reguluje spínání článků. Stejný postup je použit pro spínání ventilu a snímání kyslíku uvnitř boxu. Opět je zavedena zpětná vazba na Arduino. Tímto je zabezpečeno, aby nedocházelo k přehřívání nebo zvýšení kyslíku uvnitř boxu.



Obr. 10: Blokové schéma systému vyhřívání boxu

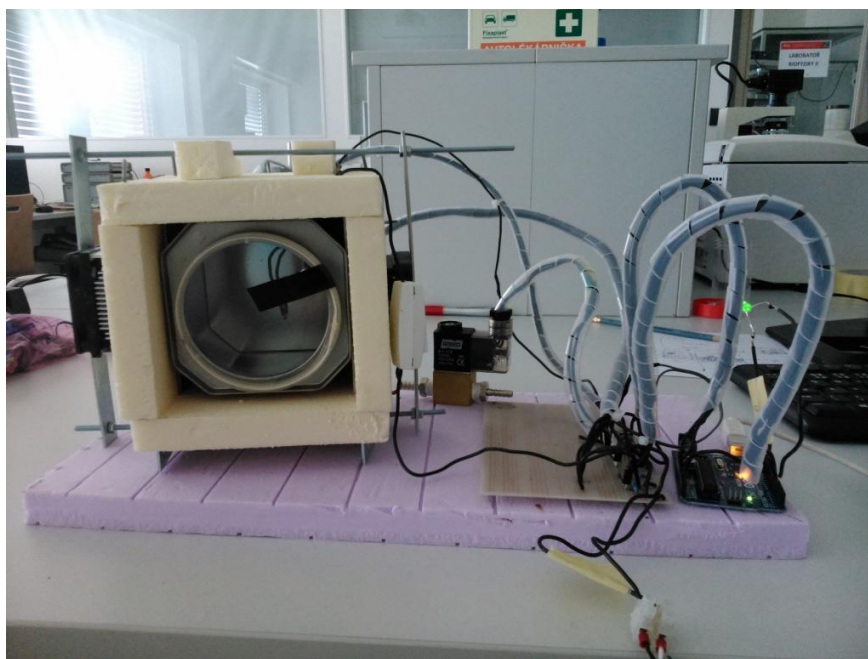
5 Komplexní vyhříváný BOX

První základní model teplotního boxu (kapitola 3.4) obsahoval pouze základní komponenty a jednoduchou mechanickou konstrukci a tepelnou izolaci. Pro lepší kultivaci buněk uvnitř boxu, přesnost regulace a dlouhodobou funkčnost bylo nutné daný základní systém vylepšit. Výsledkem je komplexní vyhříváný box, kde je přidána obvodová vnější izolace, pasivní chlazení, aktivní chlazení a regulace kyslíku. Postupný návrh a testování těchto komponent je přehledně shrnut v kapitole 5.1. Celkové schéma zapojení je zobrazeno v C1.



Obr. 11: Zobrazení jednotlivých částí systému

V grafickém zobrazení setu na nejsou zohledněny teplovodivé pasty. Tyto jsou aplikovány mezi bloky 2-9, 2-3, 3-4.



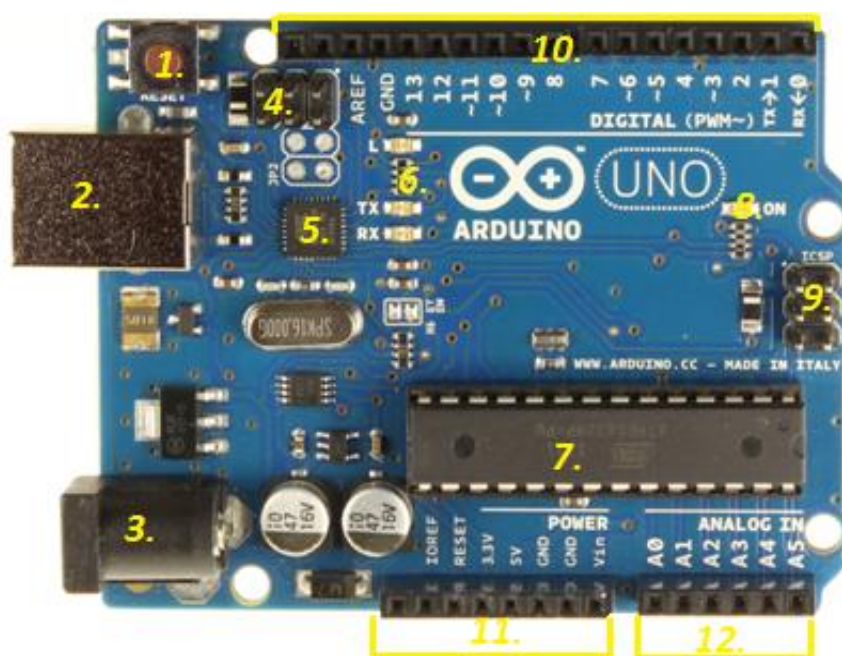
Obr. 12: Sestavený komplexní box

5.1 Realizace pomocí platformy Arduino

Pro další vývoj byla zvolena vývojová deska Arduino UNO R3 (viz Obr. 13). Oproti řešení v Labview nedokáže zobrazit výsledky graficky, ovšem celé zapojení se zjednoduší a i programová část je snadnější pro korekci. Proto se nyní budu zabývat pouze zapojením a programováním v Arduinu.

Arduino UNO je vývojová deska obsahující 8-bitový mikrokontroler ATmega 328. Deska dále obsahuje :

- 14 digitálních vstupních/výstupních pinů
- 6 analogových vstupů, 16MHz krystal
- napájení 7 - 12V nebo pomocí USB
- Paměť programu FLASH 32KB, 0,5KB použito bootloaderem
- Paměť dat SRAM 2KB, paměť dat EEPROM 1KB.



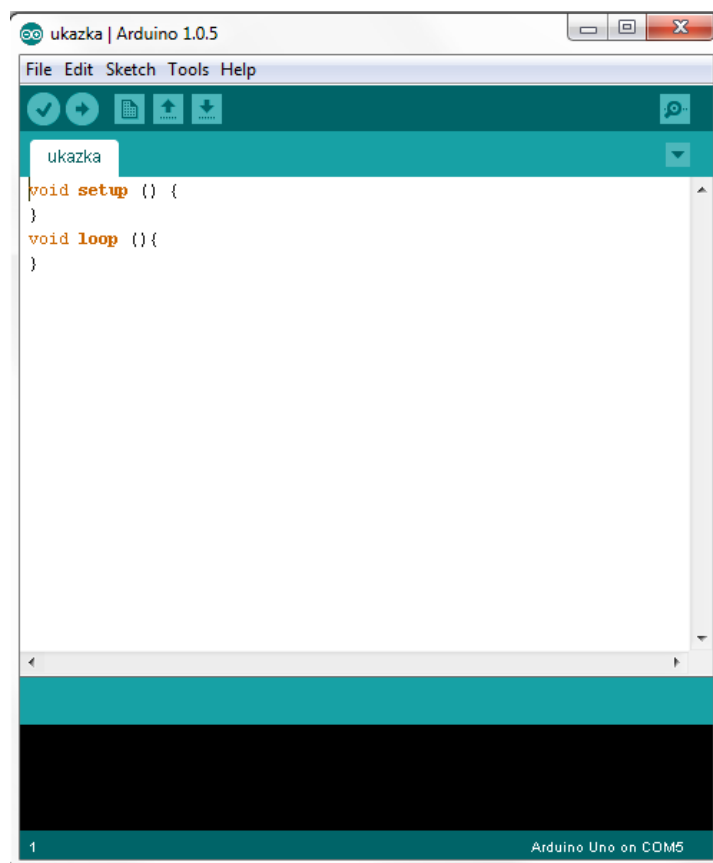
Obr. 13: vývojová deska ARDUINO UNO R3 [7]

Popis jednotlivých částí Arduina

1. Tlačítko reset, při použití se nahraný program spustí znovu od začátku
2. USB konektor, může se použít i jako napájecí
3. Napájecí konektor
4. ICSP hlavice pro externí programování USB-serial převodníků
5. USB-serial převodník - komunikace mezi PC a čipem - plní roli tzv. překladatele
6. Indikační LED diody L, Rx a Tx. Dioda L je připojena k výstupu č.13 a může se vyzkoušet blikání bez připojené externí diody. Diody Rx a Tx blikají při komunikaci přes sériovou linku
7. Hlavní čip desky - ATMEGA328
8. Indikační LED dioda - svítí při připojeném napájení

9. ICSP hlavice pro externí programování hlavního čipu, používají ji některé druhy Shieldu
10. Digitální piny
11. Napájecí výstupy Arduina, GND
12. Analogové vstupy, měření analogových veličin

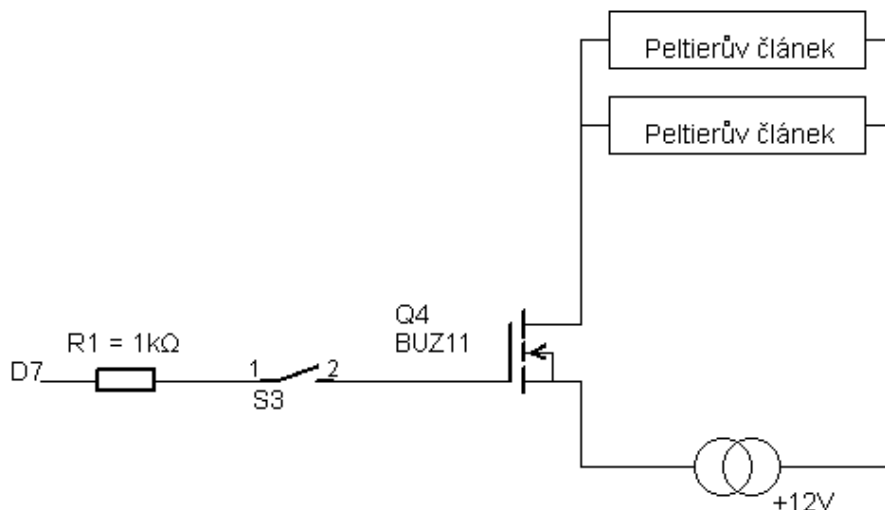
Programová část Arduina je založena na Processing, což je programovací jazyk s vlastním editorem. Jako první jsou definovány proměnné. Číselné proměnné mohou být typu byte, integer, long a float. Jako další je „void setup () {“ zde jsou deklarovány vstupy (INPUT) a výstupy (OUTPUT) pinů. Následuje samotná smyčka programu „void loop () {“. Tato smyčka se opakuje po celou dobu spuštění Arduina. Uvnitř smyčky mohou být deklarovány další cykly (for, while), samostatné výpočty, spouštění výstupních pinů a zpoždění celé smyčky Obr. 14, [7].



Obr. 14: Ukázka programovacího prostředí Arduina

5.2 Schéma zapojení tranzistorů

Digitální výstup D7 je připojen na tranzistor BUZ11 přes předřadný odpor $R1 = 1k\Omega$ a spínač. Ten je přidán aby při chybě programu bylo možné vypnout jak tranzistor tak peltierovi články, které by se dlouhým zahříváním mohly zničit. Tranzistor slouží jako spínací prvek dvou peltierových článků. Články jsou napájeny pomocí 12V zdroje napětí. Zapojení je zobrazeno na Obr. 15.



Obr. 15: Schéma zapojení pro spínání peltierových článků

5.3 Měření teploty

Teplota je měřena na Arduino pomocí analogového vstupu A1. Vstup Arduino nedokáže přímo měřit odpor teplotního čidla, proto je jako vstup použit napěťový dělič který je zobrazen na Obr. 16. Tento dělič má jeden odpor konstantní $R3=1K\Omega$ a druhý odpor je měřený $R2=NTC\ 3K3$ (teplotní čidlo). Měří se tedy napětí na teplotním čidlu. To je následně přepočítáno pomocí vzorce do hodnot Arduino.

$$teplota = (hodnota \times 5.0)/1024.0 \quad (7.)$$

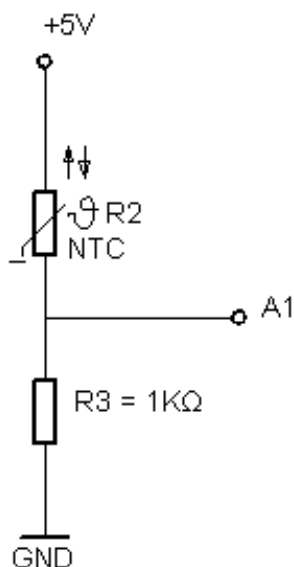
Proměnná *hodnota* je naměřené napětí na čidlu, proměnná *teplota* značí přepočítanou hodnotu pro platformu Arduino. Další rovnicí je přepočet napětí na odpor. To je dáno vztahem pro odporový dělič:

$$odpor = 1000 \times (5.0 - teplota)/teplota \quad (8.)$$

Protože při dalších výpočtech nastala chyba, bylo nutné výpočet rozdělit do dvou kroků. Prvním krokem je výpočet podle vzorce (9).

$$RR = \log(odpor/3115.0) \quad (9.)$$

Hodnota kterou dělíme odpor je dána pro teplotní čidlo. V tomto případě by hodnota měla být 3300, ale měřením bylo dokázáno, že pro větší přesnost přepočtu bylo nutno snížit tuto konstantu na 3115. Tato konstanta je výhodnější pro přepočet při vnitřní teplotě 37 °C. Při původní konstantě byla odchylka teploty naměřené pomocí čidla a teploty naměřené pomocí kalibrační teploměry GHM 3710 GREISONGER průměrně 2 °C. Při změně této konstanty na 3115.0 je odchylka asi 0,1 °C. Pro nižší teplotu je tato odchylka větší, ale to není pro tento projekt podstatné. Následně je proveden přepočet odporu na teplotu který je stejný jako v kapitole 3.5.



Obr. 16: Schéma odporového děliče pro měření teploty

Po výpočtu teploty se její hodnota porovná s nastavenými parametry. Podle podmínek se tedy na vstup tranzistoru pošle signál o daném trvání, sepne tranzistor a následně i aktivní prvek (Obr. 15). Spínání je provedeno stejně jak pro topné články tak pro elektromagnetický ventil. Jediným rozdílem je, že v obvodu ventilu není vypínač. Jako vstup je použitý digitální výstup D8 z Arduina. Hlavní část programu je zobrazena v příloze A1.

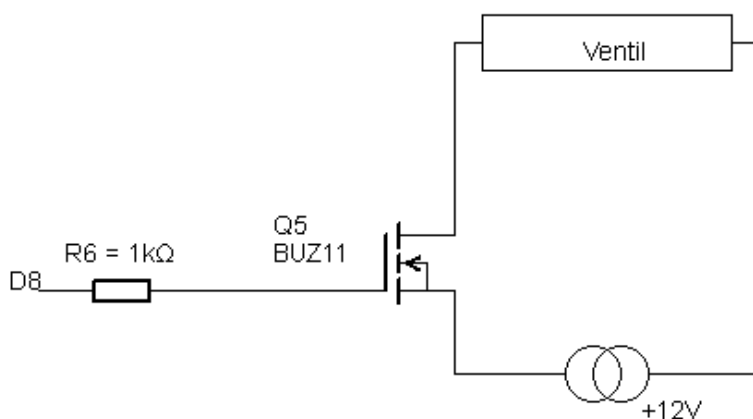
5.4 Regulace koncentrace kyslíku

Pro snímání kyslíku uvnitř boxu je použit kyslíkový senzor R-22S Oxygen Sensor od firmy Oxycheq (Obr. 17). Senzor má napěťový rozsah 0-11 mV a časovou odezvu 5 - 6 sekund. Očekávaná délka použití pro standardní měření je 36 měsíců. Měřený rozsah je 0-100% O₂ ±1%. Odezva senzoru se při dlouhodobém používání snižuje. Jedná se totiž o elektrochemický převodník. Odezva senzoru se také může snížit při nesprávném použití. Například při vystavení senzoru prostředí pro které byl vyroben, vysoké teplotě. Použitý senzor má rozsah 0 - 5 mV pro koncentraci kyslíku 0 - 100%.



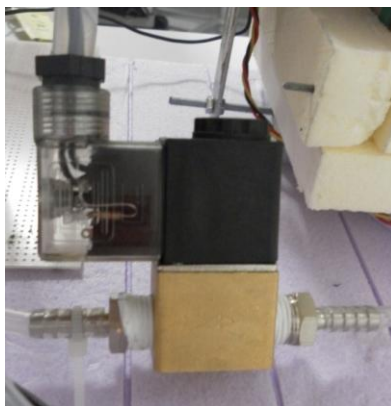
Obr. 17: Kyslíkový senzor [11]

Pro spínání elektromagnetického ventilu pro regulaci kyslíku je použito podobné zapojení jako pro regulaci teploty. Toto zapojení je zobrazeno na Obr. 18.



Obr. 18: Schéma zapojení pro spínání ventilu

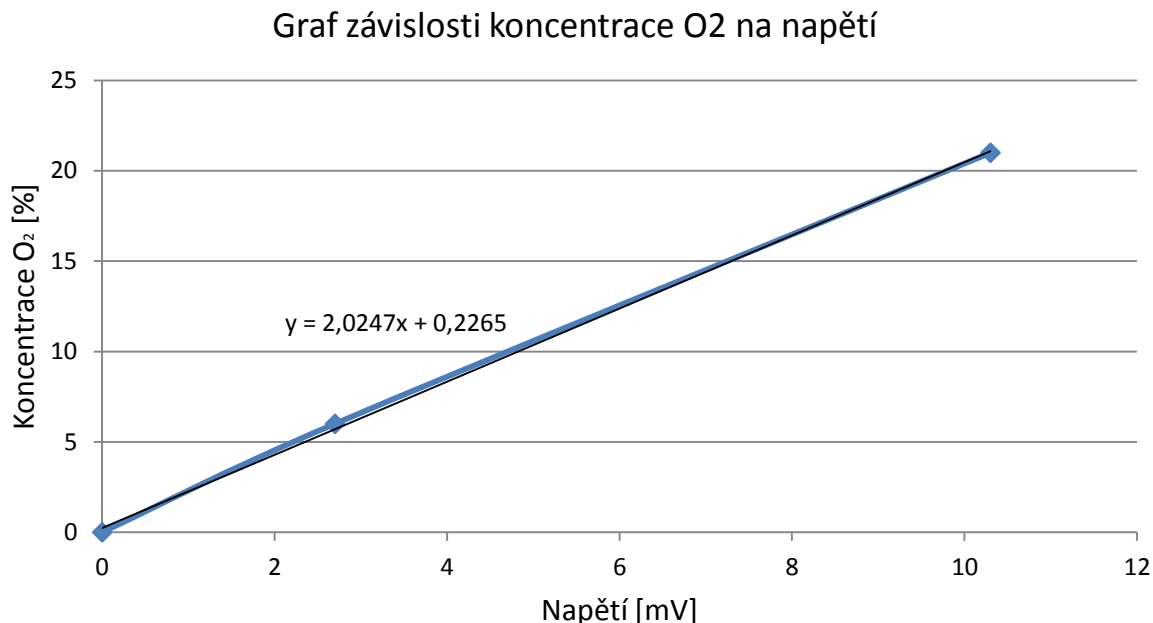
Pro samotnou regulaci atmosféry je přiváděn umělohmotnou hadičkou dusík do prostoru boxu. Množství dusíku je regulováno pomocí elektromagnetického ventilu značky AMISCO třídy EVI 7/9, který je zobrazen na Obr. 19.



Obr. 19: Ventil pro regulaci kyslíku

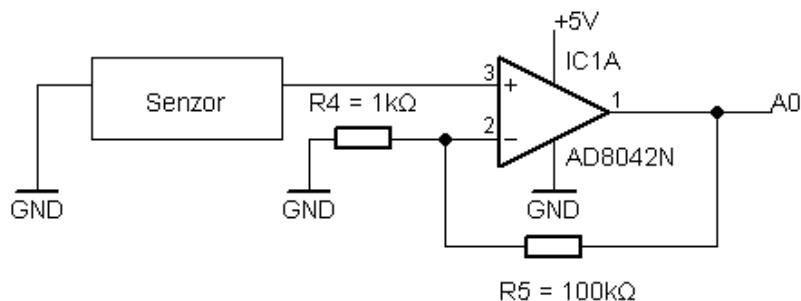
5.5 Zapojení

Při prvním pokusu měření kyslíku pomocí Arduina nebyl dosažený žádný výsledek. Deska Arduino není schopna měřit tak nízké napětí kolem 10 mV. Proto bylo nutné daný signál zesílit pomocí zesilovače, který je napájen stabilním zdrojem napětí. Obr. 20 a Obr. 21.



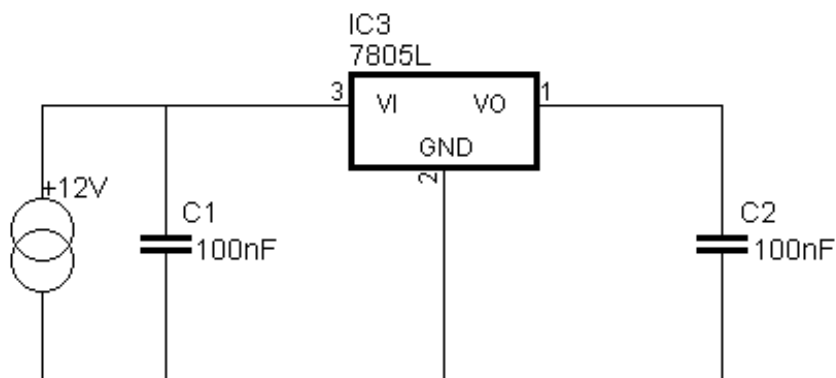
Graf 2: Koncentrace kyslíku v závislosti na napětí

Pro zesílení napětí naměřeném na kyslíkovém čidle byl použit operační zesilovač TS912IN CMOS rail-to-rail, DIP8. Zesilovač obsahuje 2 samostatné obvody pro zesílení signálu, napájecí napětí od 2,7 - 16V. Zesílení daného zapojení je 101x. Výstup zesilovače je přiveden na vstup analogového pinu A0 na Arduinu. Pro výpočet koncentrace kyslíku byl vytvořen graf závislosti koncentrace kyslíku na napětí. Hodnoty byly získány pokusným měřením zobrazeným v Graf 2.



Obr. 20: Zapojení zesilovače

Pro napájení zesilovače byl použit usměrňovač napětí L7805, který je zobrazen na Obr. 21. Výstupem je kladné stabilizované napětí pro proud 0,1A a napětí 5V. Kondenzátory jsou keramické s hodnotou 100 nF. Jako vstup je použit zdroj stejnosměrného napětí (12 V).



Obr. 21: Zapojení stabilizátoru napětí

5.6 Tepelné ztráty

V důsledku vysokých tepelných ztrát a zbytečně velkému topnému výkonu byla přidána tepelná izolace v podobě tvrzeného polystyrenu.

Tepelné ztráty jsou definovány jako okamžitá hodnota tepelné energie (přesněji tepelný tok), která z daného objektu uniká prostupem tepla skrze stěny objektu. Hodnota tepelných ztrát se spočítá pomocí rovnice (10)

$$Q = \lambda \times \frac{S \times \Delta T}{d} \times \tau \quad (10.)$$

kde Q je množství tepla, které projde stěnou za dobu τ o ploše S a tloušťce d . ΔT je rozdíl teplot na povrchích stěny a λ je součinitel tepelné vodivosti látky, tedy konstanta udávající jak je daný materiál dobrý či špatný izolant.

Tento vztah je určen pouze pro jednovrstvý materiál, po přidání další vrstvy, např. polystyrenu, je nutné tento vzorec doplnit o výpočet tepelného odporu R_T .

$$R_T = \frac{d}{\lambda} = \frac{d_1 \times \lambda_1 + d_2 \times \lambda_2}{\lambda_1 \times \lambda_2} \quad (11.)$$

$$Q = \frac{S \times \Delta T \times \tau}{R_T} [J] \quad (12.)$$

kde R_T je součet tepelného odporu pro oba materiály, λ_1 součinitel tepelné vodivosti hliníku. d_1 je tloušťka vrstvy, λ_2 součinitel tepelné vodivosti polystyrenu. d_2 je tloušťka vrstvy.

5.6.1 Výpočet tepelných ztrát

Výpočet tepelných ztrát určí, jaký výkon musí mít topné články, aby byly schopny udržet teplotu uvnitř boxu 37 °C. Do rovnice (12) dosadíme tyto hodnoty:

$$\lambda_1 = 237 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$$

$$\lambda_2 = 0,16 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$$

$$d_1 = 0,002 \text{ m}$$

$$d_2 = 0,004 \text{ m}$$

$$S = 0,056 \text{ m}^2$$

$$\Delta T = 37 \text{ °C} - 25 \text{ °C} = 12 \text{ °C}$$

$$\tau = 1 \text{ sec}$$

$$R_T = 0,02500843 \text{ m}^2\text{KW}^{-1}$$

$$Q = \frac{0,056 \times 12 \times 1}{0,0250084388} = 26,87 \text{ J} \quad (13.)$$

Tepelné ztráty při teplotě okolí 25 °C jsou tedy 26,87 J. Je tedy nutné, aby topné články udržovaly výkon 26,87 W.

5.6.2 Změřené tepelné ztráty

Pro měření teploty uvnitř boxu jsem použil teplotní senzor NTC 640 3K3 a pro přesné měření byl použit kalibrační teploměr GHM 3710 GREISONER, kalibrovaný ČMI 7.11.2013.

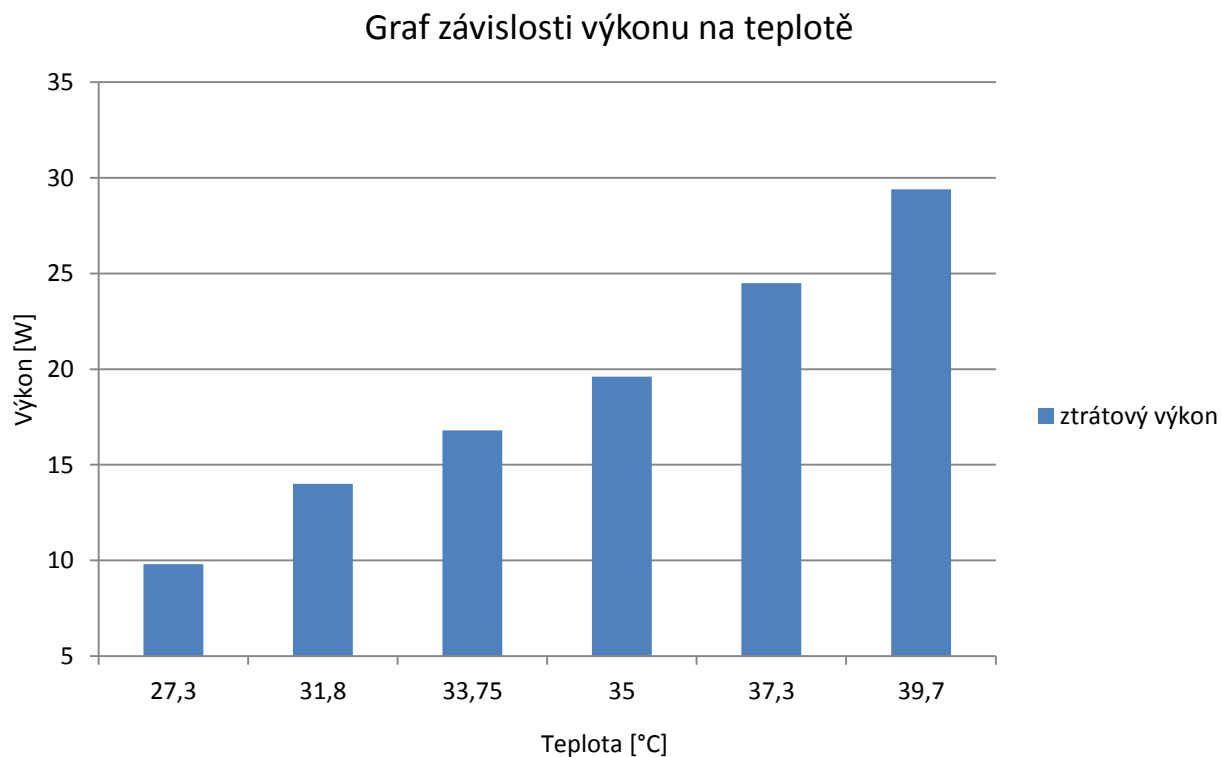
Při ověřování vypočtených tepelných ztrát se nastaví konstantní doba topení článků a poté se počká než se výkon dodávaný topnými články rovná tepelným ztrátám. Výkon topných článků se vypočítá pomocí vzorce (14).

$$P = P * T \text{ [W]} \quad (14.)$$

kde P je výkon obou topných článků (70 W) a T je čas sepnutí článků

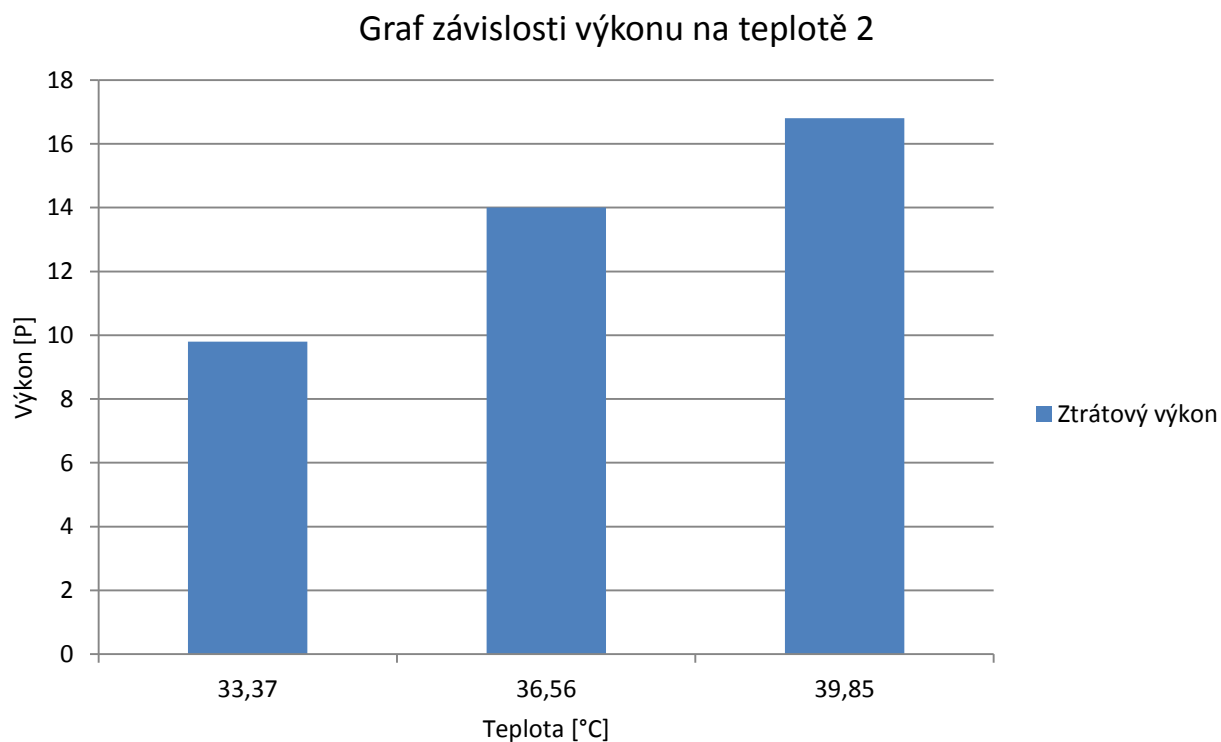
Tabulka 2: Vypočítaný výkon a změřená teplota

Doba sepnutí [ms]	Výkon článků [W]	Výkon topných článků [W]	Teplota [°C]
140	70	9,8	27,3
200	70	14,0	31,8
240	70	16,8	33,75
280	70	19,6	35,0
350	70	24,5	37,3
420	70	29,4	39,7



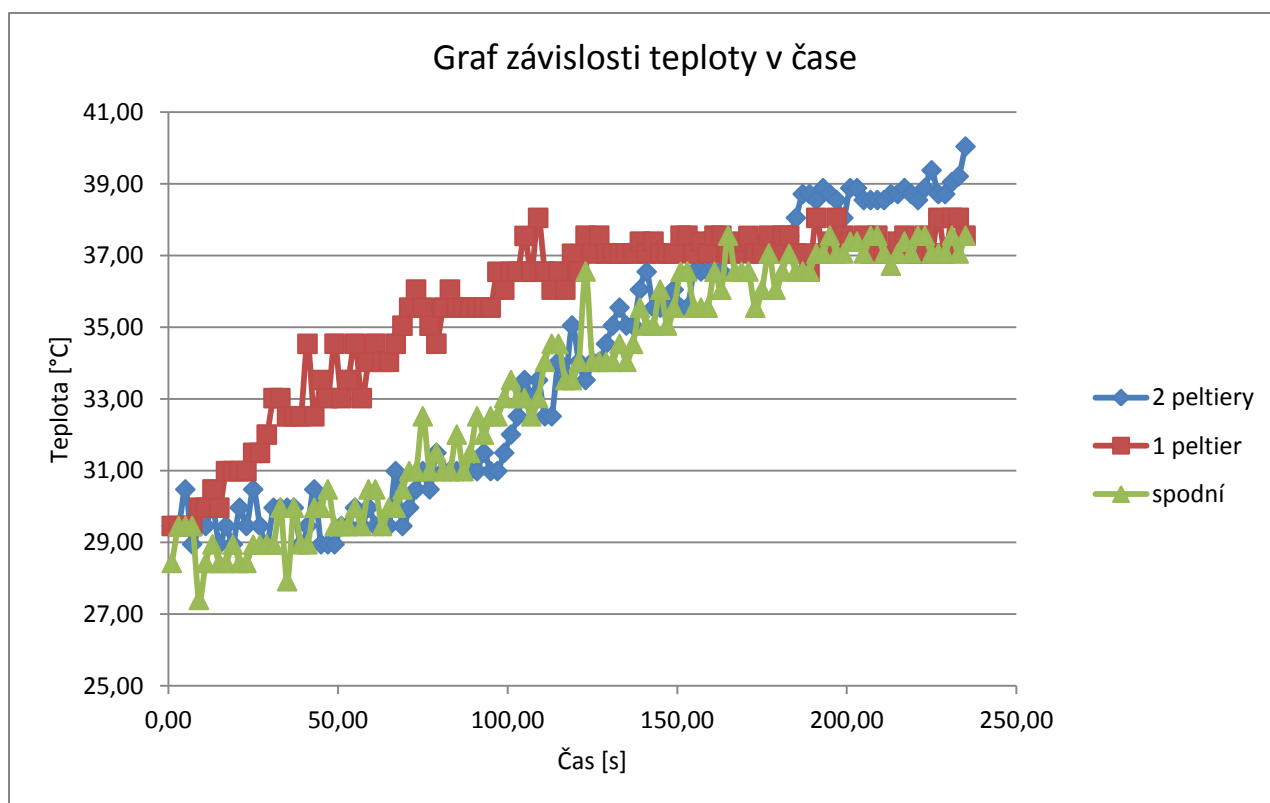
Graf 3: graf ztrátového výkonu v závislosti na teplotě - neizolovaného boxu

Z naměřených hodnot vyplývá, že ztrátový výkon pro okolní teplotu 25 °C a vnitřní teplotu 37 °C je menší než vypočítaný ztrátový výkon. Z grafu dále vyplývá, že při vnitřní teplotě 37 °C je nutné spínat oba topné články na 350 ms. Tyto hodnoty jsou pro okolní teplotu 26,12 °C, pokud by teplota okolí byla nižší, byly by tepelné ztráty větší.



Graf 4: Graf ztrátového výkonu v závislosti na teplotě - izolovaný box

V Graf 4 je zobrazen ztrátový výkon pro izolovaný box. Z grafu je vidět, že pro vytopení boxu je potřeba přibližně poloviční výkon.

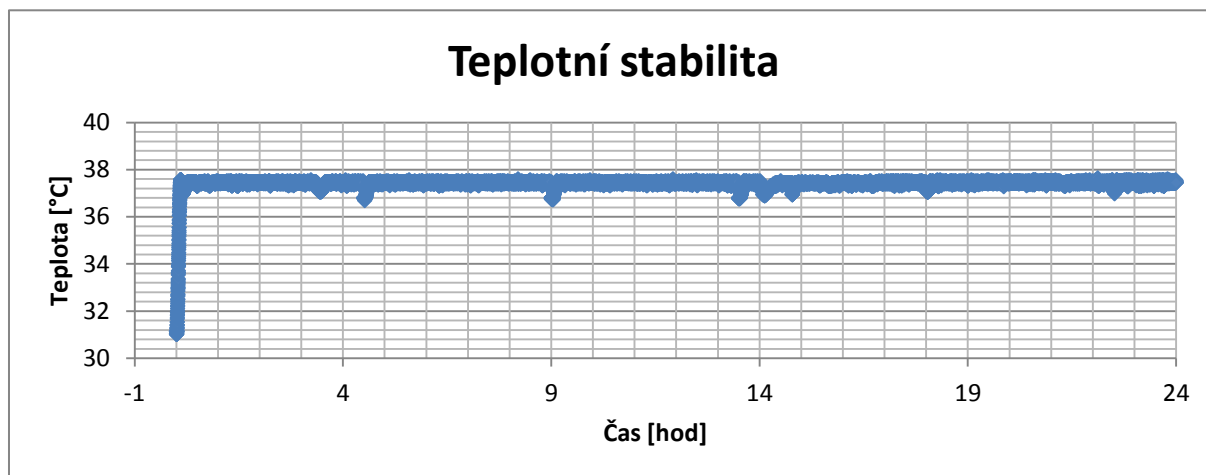


Graf 5: závislost teploty na čase pro různé druhy vytápění

Graf 5 zobrazuje účinnost vytápění pomocí jednoho, či dvou peltierových článků. Také je zobrazeno vytápění při umístění topného článku pod boxem a na straně. Tyto měření byly provedeny čidlem KTY 81-120. Při měření tímto čidlem, bylo zjištěno, že maximální odchylka od skutečné hodnoty je v rozmezí 1,3 - 1,5 °C. Proto bylo pro další měření zvoleno čidlo NTC 640 3K3, které má odchylku od měřené hodnoty 0,1°C.

5.7 Teplotní stabilita systému

Přežití buněk závisí na stabilním prostředí, proto je důležité udržovat stabilní teplotu v rozmezí $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. V Graf 6 je viditelné snížení teploty každých 4,5 hodiny. To je způsobeno spuštěním ventilu a napuštěním komory dusíkem.



Graf 6: Teplotní stabilita systému za 24 hodin při konstantním dopouštění dusíku

5.8 Výstup systému

Po připojení Arduina k počítači pomocí USB kabelu a spuštění programu, můžeme zaznamenávat výsledky teploty a koncentrace kyslíku. Ty se zobrazují ve sloupcích, kdy koncentrace kyslíku je měřena každých 30 sekund, teplota je měřena každou sekundu a následně je vypočítána průměrná teplota ze 3 po sobě jdoucích měření. Ukázka výstupu je zobrazena na Obr. 22.

kyslík	11.16%	Zesílené napětí	556.64mV		
tep	29.29	tep	29.29	tep	29.29
tep	29.29	tep	29.29	tep	29.42
tep	29.42	tep	29.42	tep	29.42
tep	29.42	tep	29.42	tep	29.42
tep	29.42	tep	29.55	tep	29.55
tep	29.55	tep	29.55	tep	29.69
tep	29.69	tep	29.69	tep	29.82
tep	29.69	tep	29.82	tep	29.82
tep	29.82	tep	29.82	tep	29.96
tep	29.96	tep	29.96	tep	29.96
kyslík	10.87%	Zesílené napětí	541.99mV		
tep	30.09	tep	30.09	tep	30.09
tep	30.22	tep	30.22	tep	30.22
tep	30.22	tep	30.35	tep	30.35
tep	30.35	tep	30.49	tep	30.49
tep	30.49	tep	30.62	tep	30.62
tep	30.62	tep	30.62	tep	30.75
tep	30.75	tep	30.75	tep	30.88
tep	30.88	tep	30.88	tep	30.88
tep	31.02	tep	31.02	tep	31.15
tep	31.15	tep	31.15	tep	31.28
kyslík	11.26%	Zesílené napětí	561.52mV		
tep	31.28	tep	31.41	tep	31.41
tep	31.41	tep	31.54	tep	31.54
tep	31.54	tep	31.67	tep	31.67
tep	31.67	tep	31.81	tep	31.81
tep	31.81	tep	31.94	tep	31.94
tep	31.94	tep	32.07	tep	32.07
tep	32.07	tep	32.20	tep	32.20
tep	32.20	tep	32.33	tep	32.33
tep	32.33	tep	32.46	tep	32.46
tep	32.46	tep	32.46	tep	32.59

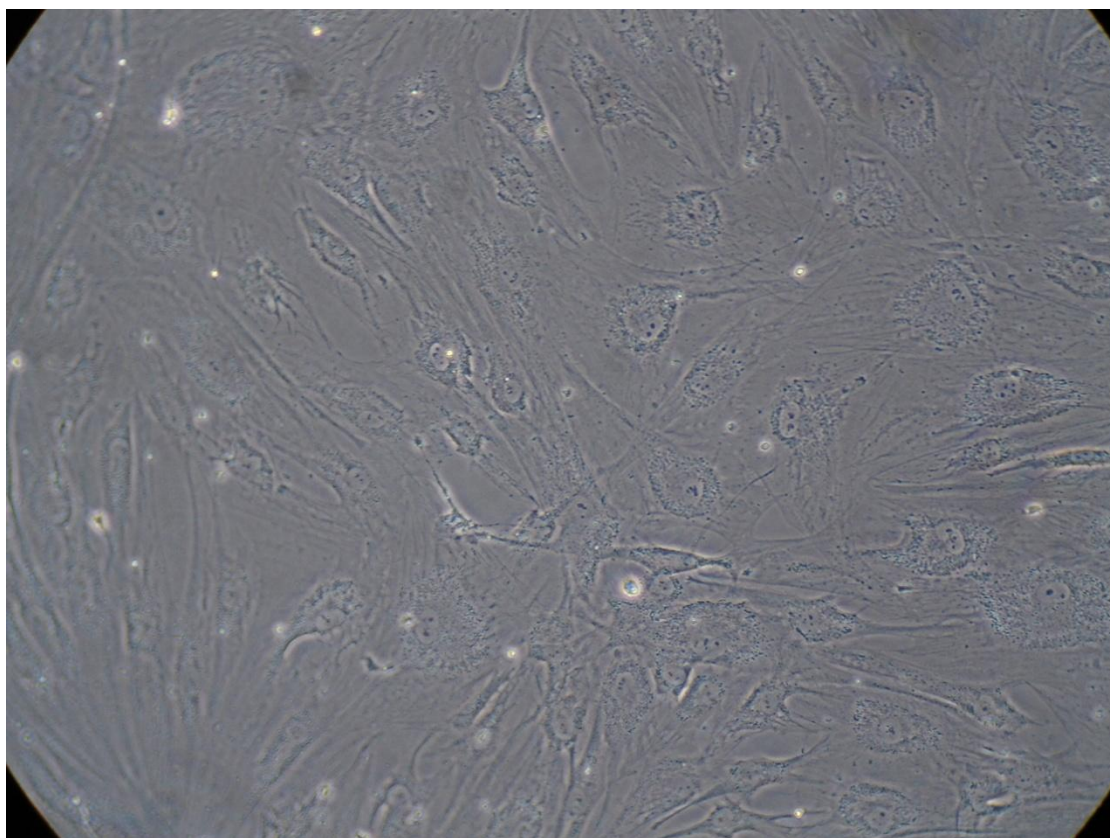
Obr. 22: Výstup systému po připojení k počítači přes USB

6 Test přežívání a diferenciaci buněk v základní verzi boxu a v komplexní verzi boxu

Základním využitím inkubačních boxů je množení buněk mimo živý organismus. Tyto buňky vykazují stejné vlastnosti a jsou vhodné pro testování.

6.1 Test základní verze vyhřívaného boxu

Do Petriho misky (použity misky P35G-1.5-10-C, výrobce MaTTek) byly nasazeny MSC buňky v počtu 2,5 tisíc buněk a zality médiem DMEM s Penicilinem (2%) a vloženy do sestaveného základního vyhřívaného boxu. Po 24 hodinách kultivace vykazovaly buňky standardní morfologii (Obr. 23) a barvení metodou Trypan Bleue prokázalo, že viabilita je 93%. Můžeme tedy konstatovat, že teplotní a jiné fyzikální podmínky sestaveného boxu jsou pro použité MSC buňky relativně bezpečné.



Obr. 23: typická morfologie MSC buněk po 24 hodinách

Další test měl ověřit možnost dlouhodobé inkubace MSC buněk a jejich diferenciaci do chondrocytů. Pro stimulaci diferenciaci byla použita komerční metoda STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit. Pro první 4 hodiny kultivace byly použity:

MSC Attachment medium, které obsahuje (ve 100 ml):

- DMEM low glucose: 89 mL
- MSC-qualified FBS: 10 mL o koncentraci 10%
- GLUTAMAXTM - I (200 mM): 1mL o koncentraci 2 mM

- Gentamicin (10 mg/mL): 50 μ L o koncentraci 5 μ g/mL

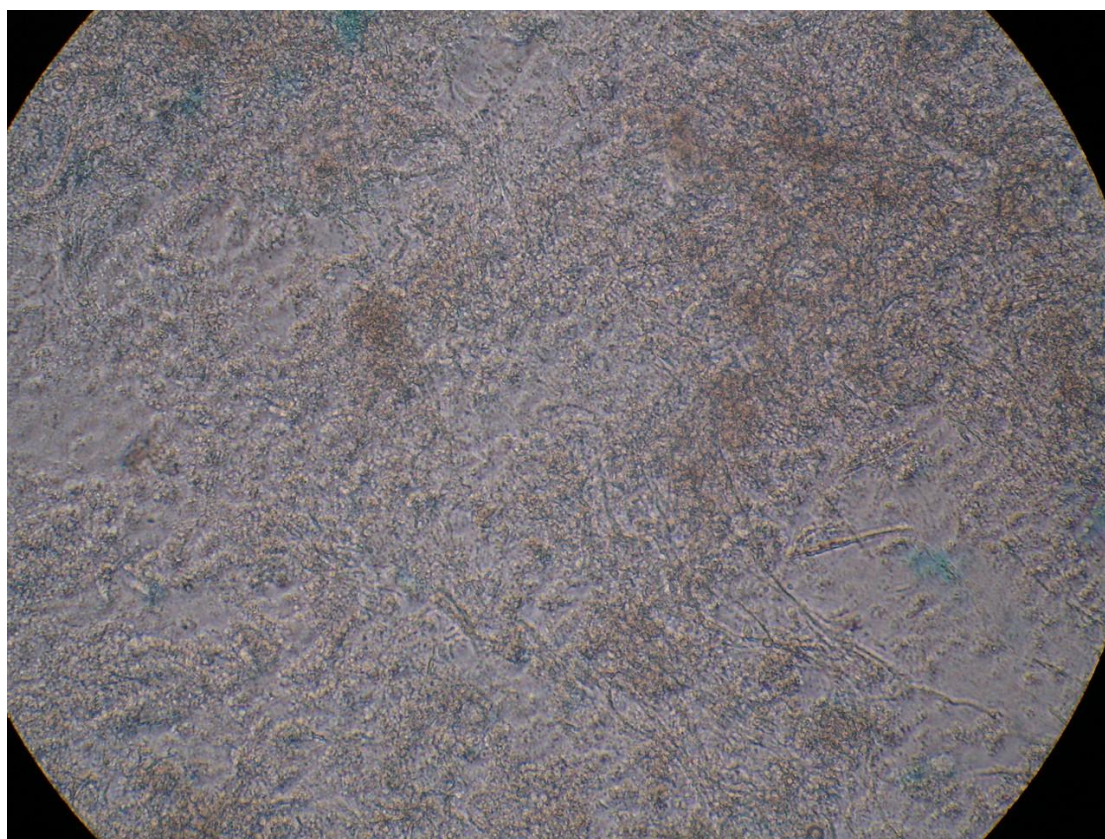
A následně bylo použito pro 14 denní kultivaci diferenciační medium se složením:

STEMPRO®Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (90 mL)

STEMPRO®Chondrogenesis Supplement (10 mL)

Penicilin (2%), [2].

Pro správnou kultivaci buněk je zapotřebí vyměňovat kultivační médium každé 2 - 3 dny. Po 14 dnech bylo na vrstvu buněk nanášeno barvivo Alcain Blue, které se specificky během několika minut váže na buňky s chondrocytární diferenciací. Po omytí barviva a zalití průhledným fyziologickým roztokem bylo pozorováno, kolik buněk je pozitivní na Alcain Blue (modré oblasti na Obr. 24). Procento buněk které jsou pozitivní v našem základním testu bylo kolem 3%.



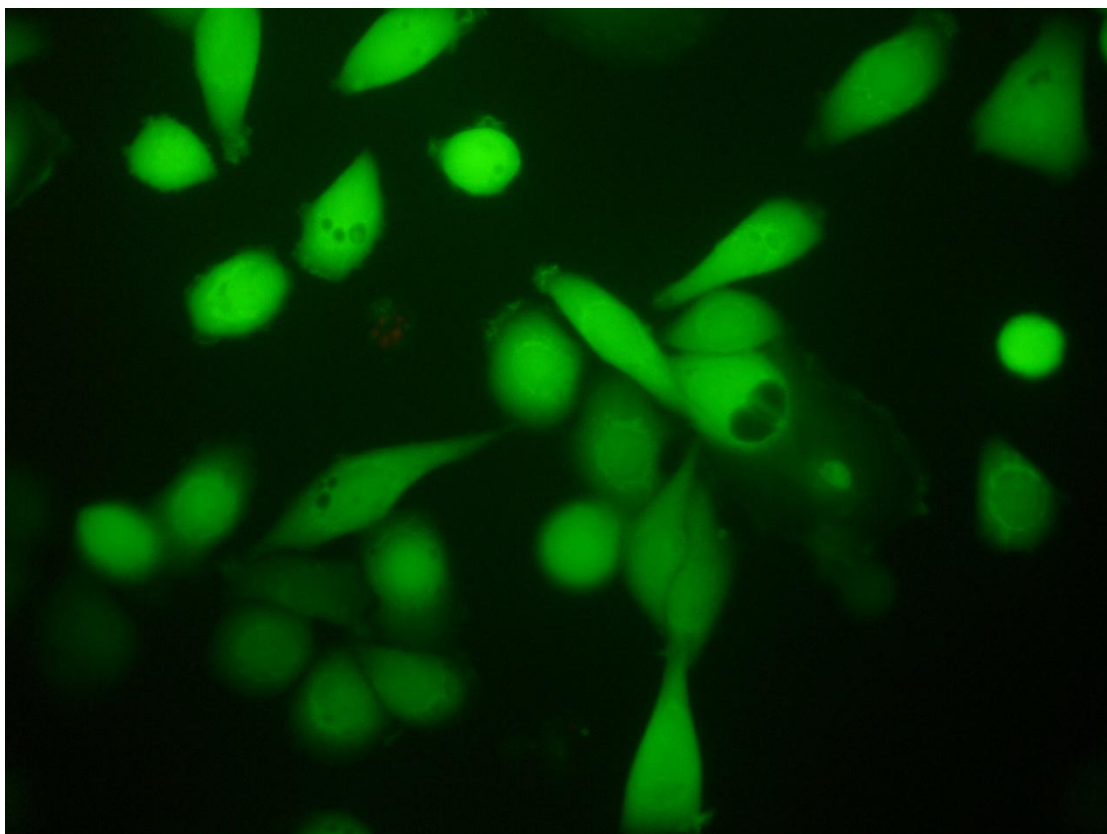
Obr. 24: Buňky obarvené barvivem Alcain blue

6.2 Test komplexní verze vyhřívání boxu

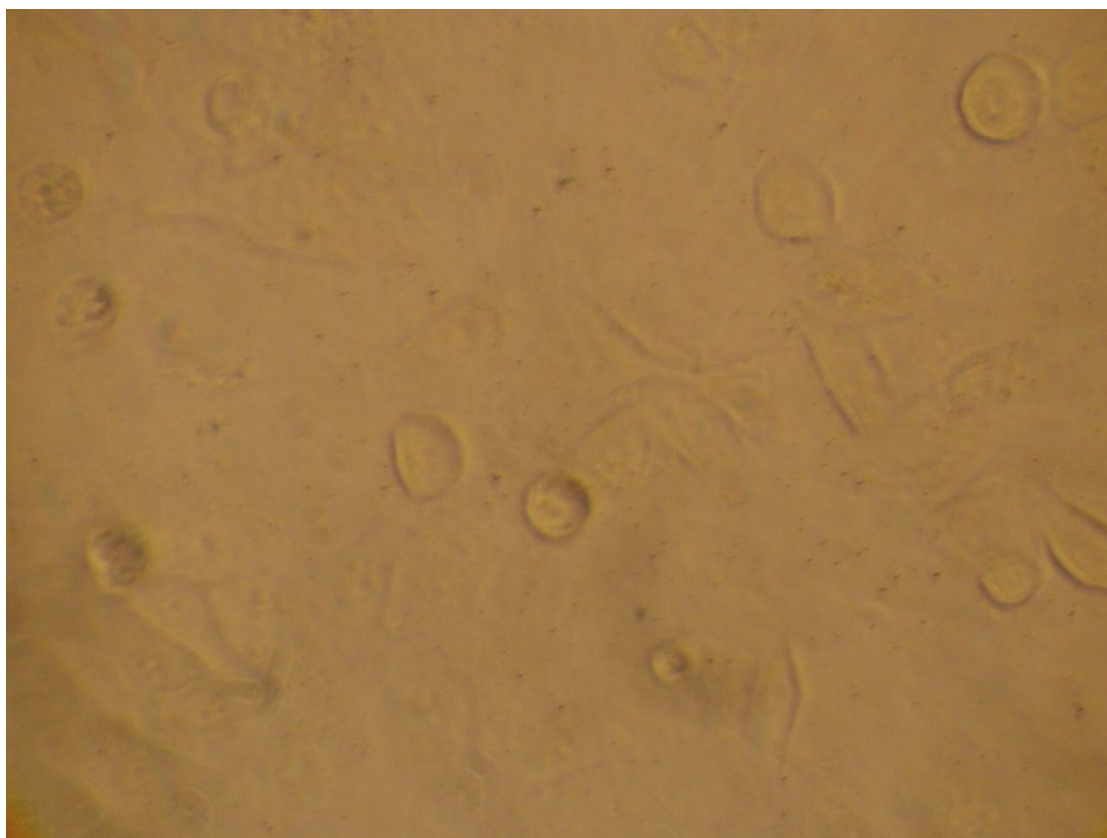
Do Petriho misky (použijeme misky P35G-1.5-10-C, výrobce MaTTek) byly nasazeny MSC buňky v počtu 2,5 tisíc buněk a zality médiem DMEM s Penicilinem (2%) a vloženy do sestaveného komplexního vyhřívání boxu. Po 24 hodinách kultivace vykazovaly buňky standardní morfologii (Obr. 25; Obr. 27) a barvení Calceinovou metodou prokázalo, že viabilita je 95% (Obr. 26; Obr. 28). Testované buňky byly po celou dobu kultivace v prostředí se sníženou koncentrací kyslíku.



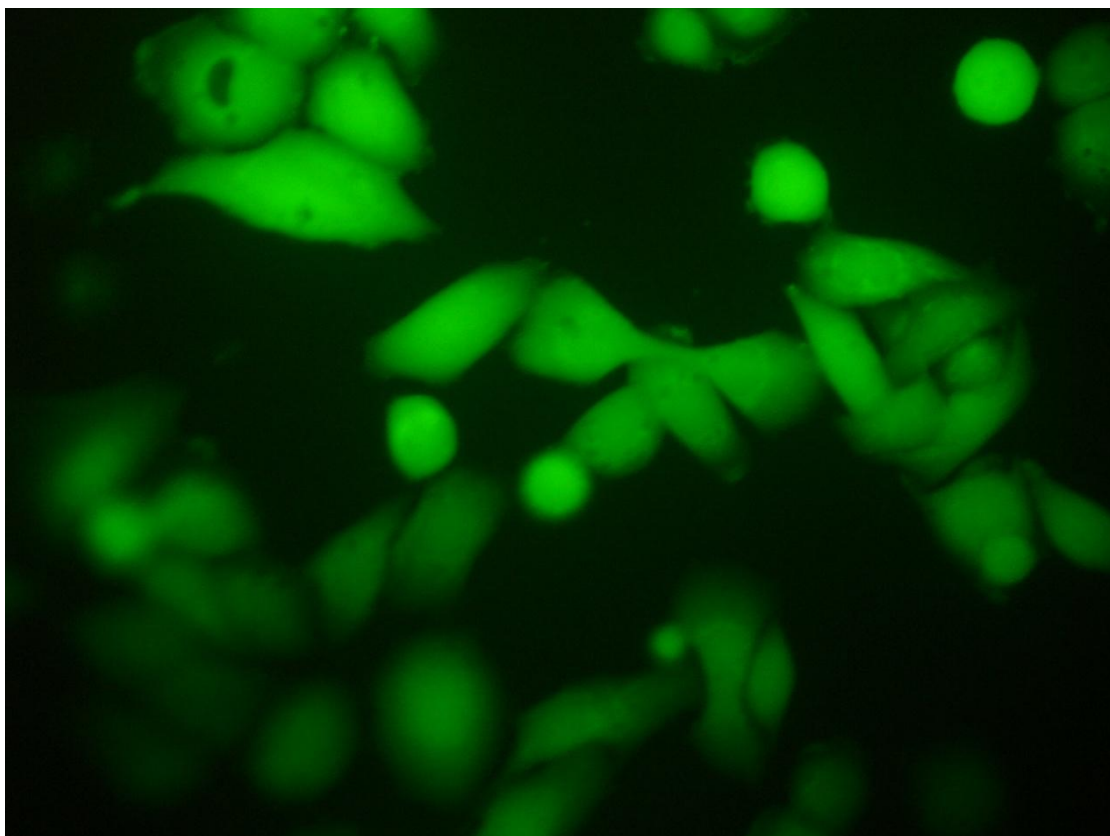
Obr. 25: MSC buňky po 24 hodinách - 1.vzorek



Obr. 26: Buňky obarvené Calceinovou metodou - 1.vzorek



Obr. 27: MSC buňky po 24 hodinách - 2.vzorek



Obr. 28: Buňky obarvené Calceinovou metodou - 2.vzorek

7 Diskuze

Vytvořený systém pro inkubaci buněk in vitro je schopen regulace teploty a kyslíku. Případné změny programu se mohou nastavit v prostředí Arduina při připojení k počítači pomocí USB kabelu. Program je rozdělen do několika podmínek, které regulují spouštění akčních prvků, aby nedocházelo k přehřívání boxu. Při prvních testech docházelo k přehřívání peltierových článků, a proto bylo nutné zajistit jejich neustálé chlazení pomocí ventilátorů a hliníkového žebrování. Při dalších testech byly zjištěny velké teplotní ztráty, a proto byla přidána venkovní izolace z tvrzeného polystyrenu. Tato izolace snížila tepelné ztráty a tak mohl být snížen výkon topných článků více jak o 1/3, což snižuje celkovou spotřebu energie systému.

Pro samotnou regulaci kyslíku bylo nutné sestavit zesilovač napětí, protože použité čidlo má výstupní napětí do 10 mV. Tuto hodnotu nebylo možno měřit pomocí desky Arduino. Kyslík je regulován pomocí ventilu, který vpouští do boxu dusík a snižuje tedy koncentraci kyslíku. Při měření napětí na čidle docházelo k velkým nepřesnostem. Použité (dostupné) čidlo je již delší dobu používáno a tudíž napětí na něm měřené nepřesahuje 5 mV. Při použití zesilovače byla naměřena "správná" koncentrace kyslíku. Jak jsem zmínil již v textu, použité čidlo dosahuje polovičních hodnot při maximální koncentraci měřené veličiny. Proto je výsledná koncentrace kyslíku poloviční. Tato problematika je rozepsána v kapitole 5.4 a 5.5. Samotný program obsahuje vzorec pro přepočet napětí na koncentraci kyslíku, jednotlivé časy spuštění ventilu jsou přibližné. Pro jejich doladění je potřeba nové kyslíkové čidlo. Tepelná stabilita systému odpovídá podmínkám pro růst buněk. Rozsah teploty nepřekračuje 0,5°C s výjimkou spouštění ventilu pro dusík. Studený dusík sníží teplotu uvnitř boxu o 0,6°C.

Systém byl testován pro MSC buňky, které byly následně nafoceny a obarveny, aby se daly lépe zobrazit. Z Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27 a Obr. 28 je vidět, že daný systém je použitelný pro kultivaci buněk.

8 Závěr

V této bakalářské práci se zabývám sestavení vyhřívaného setu pro kultivaci buněk in vitro. Podrobně jsem rozepsal kultivační podmínky pro kultivaci MSC buněk in vitro a možnosti opravy poškozené kloubní chrupavky pomocí takto kultivovaných buněk. V další kapitole rozebírám regulaci teploty. Základy spojitě a nespojitě regulace, P, D, I a PID regulace. Dále popisuji teplotní senzor a vyhřívací prvek (peltierův článek), zapojení čidel a měření teplotního profilu pomocí programu Labview. Na základě teoretického rozboru těchto regulačních komponent jsem sestavil základní verzi vyhřívaného boxu pro kultivaci MSC buněk. Následně jsem konstrukci testoval a zdokonalil po mechanické stránce i z hlediska lepší tepelné izolace vnitřního prostoru a elektronické regulace teploty. Regulace kyslíku uvnitř boxu je možná při nastavení hodnot pro dopouštění dusíku. Tuto problematiku jsem popsal v kapitole 7.

Na závěr jsem prokázal praktickou funkčnost základní i komplexní verze vyhřívaného boxu. Testoval jsem diferenciaci MSC buněk do chondrocytů a jejich viabilitu.

Literatura

- [1] MAŤÁTKO, Jan. *Elektronika*. 6. vyd., V Idea servis 4. vyd. Praha: Idea servis, 2005. ISBN 80-859-7049-X
- [2] MATĚJKOVÁ, Eva. *Mezenchymální stromální buňky: Možnosti kultivace a jejich následné terapeutické využití* [online]. Brno, 2009 [cit. 2013-11-12]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/14643/prif_r/Rigorozni_prace_FINAL_PDF.pdf. Rigorózní práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce prof. MUDr. Jaroslava Michálka, PhD.
- [3] MEJZLÍK, Michal. *Návrh a tvorba laboratorní úlohy s Peltierovým článekem*. Brno, 2009. Dostupné z: http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=15693. Diplomová práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií Ústav elektroenergetiky. Vedoucí práce Ing. Jan Macháček.
- [4] *STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit*. 22 May 2008, 2 s. Dostupné z: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/stempro_chondro_diff_man.pdf
- [5] ŠVARC, Ivan. *Automatizace: automatické řízení*. 2. doplň. vyd. Brno: CERM, 2005, 262 s. ISBN 80-214-2943-7.
- [6] AMISCO S.P.A. *EVI 7 S9: Solenoid System*. 2013. vyd. Italy, 2013, 12 s. Dostupné z: <http://www.amisco.it/public/EVI7s9.pdf>
- [7] Arduino: Arduino Uno. *Arduino* [online]. 2014 [cit. 2014-05-25]. Dostupné z: <http://arduino.cc/en/Main/arduinoBoardUno>
- [8] HALAS, V., P. KOS, P. JENDELOVÁ, P. LESNÝ, T. TRČ a E. SYKOVÁ. *Výsledky srovnání chondrogenní diferenciace mezenchymálních kmenových buněk získaných z tukové tkáně s kultivovanými chondrocyty a mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřevě* [online]. ACTA CHIRURGIAE ORTHOPAEDICAE ET TRAUMATOLOGIAE ČECHOSL, 2011, roč. 78, č. 2, 2011 [cit. 2013-12-14]. Dostupné z: <http://www.achot.cz/detail.php?stat=436>. 6.
- [9] Kroužky fyziky na MFF UK. JÍLEK, M. [online]. 2006, 19.1.2006 [cit. 2014-05-20]. Dostupné z: <http://fyzweb.cuni.cz/dilna/krouzky/uvod/uvodni.htm>
- [10] Measure Temperature using 10kΩ Thermistor, myDAQ, and LabVIEW. *National Instruments* [online]. 2010, 23.7. [cit. 2013-12-14]. Dostupné z: <http://www.ni.com/example/31408/en/>
- [11] OxyCheq: ANALYZER & SENSORS. [online]. 2014 [cit. 2014-05-20]. Dostupné z: [11] <http://www.oxycheq.com/analyzers-sensors/sensors/r-22s-oxygen-sensor.html>
- [12] VLČEK, Jiří. *Regulace teploty v budovách: teoretická základna*. [online]. 2.4.2007 [cit. 2013-11-24]. Dostupné z: <http://www.tzb-info.cz/4015-regulace-teploty-v-budovach-teoreticka-zakladna>

Seznam symbolů, veličin a zkratk

K	zesílení
R	odpor
I	proud
U	napětí
P	výkon
e	regulační odchylka
Q	teplo
λ	součinitel tepelné vodivosti látek
S	plocha
d	tloušťka
ΔT	rozdíl teplot
τ	čas
R_T	tepelný odpor
PID	proporcionálně integračně derivační regulátor
PE	polyetylen
MSC	mezenchymální stromální buňky
NTC	termistor s negativním teplotním koeficientem
MU	Masarykova univerzita
A_{1-N}	analogové vstupy Arduino
D_{1-N}	digitální vstupy/výstupy Arduino
$A_1; B_1; C_1; D_1$	konstanty pro výpočet teploty

Přílohy

A1. Zdrojový kód

```
void setup () {
  Serial.begin(9600);
  Serial.println("Zahajeni komunikace");
}
void loop () {
  teplota_3 = 0;
  digitalWrite (led1, LOW);
  pomocna = analogRead (kyscid);
  kys1 = (pomocna * 5.0)/1024.0;
  kys1 = kys1*1000;
  kys =(2.0247*kys1+ 0.2265);
  kys = kys /101;
  digitalWrite (ventil, HIGH);
  delay (20000);
  digitalWrite (ventil, LOW);

  for (n = 0; n<5000; n++){
    teplota_3=0;
    for (i=0; i<3; i++) {

      hodnota = analogRead(term);
      teplota = (hodnota * 5.0)/1024.0;
      odpor = 1000*(5.0-teplota)/teplota;
      float RR = log(odpor/3115.0);
      teplota = 1 / (0.003354016 + 0.000299341 * RR + 0.000002134133 * RR * RR -
0.000000005672 * RR * RR * RR);
      teplota = teplota - 273.15;
      regod= temp-teplota;

      pole[i] = teplota;
      teplota_3 = pole[i] + teplota_3;
      Serial.print("tep      ");
      Serial.print(teplota);
      Serial.print("    ");

      if (teplota <= 33) {
        digitalWrite (pel, HIGH);
        digitalWrite (led, HIGH);
        delay (40*regod);
        digitalWrite (pel, LOW);
        digitalWrite (led, LOW);
        delay (1000-40*abs (regod));
      }

      else if ((teplota >33) && (teplota <= 36.5)){
        digitalWrite (pel, HIGH);
        digitalWrite (led, HIGH);
        delay (140 + regod*40);
        digitalWrite (pel, LOW);
```

```

        digitalWrite (led, LOW);
        delay (860-40*regod);
    }

    else if ((teplota > 36.5) && (teplota <= 37.5)) {
        digitalWrite (pel, HIGH);
        digitalWrite (led, HIGH);
        delay (160);
        digitalWrite (pel, LOW);
        digitalWrite (led, LOW);
        delay (840);
    }

    else if (teplota > 37.5) {
        digitalWrite (pel, LOW);
        digitalWrite (led, LOW);
        delay (1000);
    }
}

teplota_3 = teplota_3/3.0;
Serial.print("prumer  ");
Serial.print(teplota_3);
Serial.println();
}
    Serial.println();
}

```

B1. Seznam použitých součástek

Označení	Hodnota
R1	1K Ω
R2 - NTC 3K3	3,3K Ω
R3	1K Ω
R4	1K Ω
R5	100K Ω
R6	1K Ω
C1,2	2 x 100nF
IC3	7805L
Q2, Q3	2 x BUZ11
IC4A	TS912IN
S1	Spínač
Peltierův článek	2 x 35W
Ventil	AMISCO EVI 7/9
Ventilátor	2 x 12V
Arduino UNO R3	-
Senzor	PSR-11-39-JD Osygen Sensor
Zdroj napětí	12V

C1. Schéma zapojení

